

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



LA FRACCIÓN NITROGENADA DEL VINO. PÉPTIDOS BIOACTIVOS.



JUAN MARÍA ALCAIDE HIDALGO

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Madrid, 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

LA FRACCIÓN NITROGENADA DEL VINO. PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Memoria presentada por:

JUAN MARÍA ALCAIDE HIDALGO

Para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dra. CARMEN POLO SÁNCHEZ

Dra. ENCARNACIÓN PUEYO PÉREZ

Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC

D^a M^a DEL CARMEN POLO SÁNCHEZ, DOCTORA EN FARMACIA, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL C.S.I.C. Y D^a ENCARNACIÓN PUEYO PÉREZ, DOCTORA EN CIENCIAS, TITULADO SUPERIOR DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL C.S.I.C.

CERTIFICAN,

Que el presente trabajo titulado: “Fracción Nitrogenada del Vino. Péptidos Bioactivos” y que constituye la Memoria que presenta el Licenciado **D. Juan María Alcaide Hidalgo**, para optar al grado de doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C.

Y para que conste, firman el presente certificado en Madrid, a nueve de Marzo de 2007.

Fdo.: M^a Carmen Polo

Fdo.: Encarnación Pueyo

A la humildad

Esta Tesis ha sido desarrollada en el Departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), gracias a una beca concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia. Mi agradecimiento y gratitud al Instituto de Fermentaciones Industriales, a la directora del mismo, la Dra. Lourdes Amigo y al equipo directivo, por poner a mi disposición todos los medios técnicos y académicos puesto a mi disposición para la realización de esta Tesis.

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. M^a Carmen Polo Sánchez y la Dra. Encarnación Pueyo Pérez, a las cuales les agradezco de manera especial la posibilidad que me han brindado para iniciarme en la investigación, trabajar en su grupo de investigación, sus enseñanzas y orientaciones, y sobre todo el apoyo y la confianza depositada en mí.

Quisiera agradecer a la Dra. Elena Ibáñez el haber aceptado ser mi tutora en esta Tesis y el trato agradable recibido por su parte.

Especialmente quiero agradecer a la Vrije Universiteit Ámsterdam por los medios técnicos puestos a mi disposición durante los seis meses de mi estancia realizada en Ámsterdam y, en particular, al Dr. Hubertus Irth y su grupo de investigación por su apoyo, amabilidad, enseñanzas y total confianza sobre mi.

Mi agradecimiento a las Dras. Mercedes Ramos y M^a Victoria Moreno, jefas del Departamento de Caracterización de Alimentos, durante la realización de esta Tesis, por su aceptación y apoyo para trabajar en su departamento.

Quiero agradecer a las Dras. Rosina López, Elena Molina, Isidra Recio y Josefina Belloque por la ayuda recibida durante este tiempo. Muchísimas gracias al Dr. Pedro Martín-Álvarez por su disposición y ayuda con la parte estadística de esta Tesis.

De manera especial, quiero agradecer a los Dres. Adolfo Martínez y Blanca Hernández por su amistad, ayuda y buenos consejos recibidos por su parte.

Gracias también al personal de secretaría y de laboratorio por su ayuda técnica, especialmente a Constanza Talavera.

Mi gratitud a mis compañeras Dra. María Manso, Dra. Miriam del Pozo, Dra. Carolina Simó y Dr. Fabio Minervini y a mis compañeros Almudena, Patricia, Davinia, Teresa, Wilman, Irene y Pablo por su amistad durante la realización de esta Tesis. Mi más sincero agradecimiento a Isabel, Patricia, Raquel, Níco, María y Ana por su colaboración y apoyo en los meses de prácticas que pasaron por aquí, y especialmente, a Amaia por todos estos momentos divertidos que pasamos juntos y su inestimable ayuda en todo momento.

Mi mas sincero afecto y cariño a mis compañeros de Holanda, Dres. Hans Krabbe, Arjen de Boer y a Jeroen Carol, Johannes Hoos, Junko Hirata y Diego Millo por hacer que pasara seis meses estupendos e inolvidables en mi estancia.

También quisiera dar, especialmente, las gracias a mis compañeros de laboratorio, los Dres. Ana Quirós, Iván López y Miguel Herrero y a Rosa por su compañerismo y su amistad y les doy mi gratitud por todas esas risas fuera del laboratorio. y por hacer que exista un gran ambiente de trabajo en el laboratorio. A Yolanda, Graci y M^a del Mar les agradezco sinceramente la ayuda y el cariño ofrecido durante la realización de este Tesis y, especialmente, durante la escritura de la misma y su apoyo y comprensión recibida en los momentos más críticos de esta escritura.

También quiero dar mi gratitud a mis amigos y compañeros de trabajo, Dr. David Arráez, felicitades Papi, y Dr. José Ángel Gómez por los ratos compartidos juntos, que nunca se me olvidaran. A todos ellos me gustaría darles mi más sincera gracias por el apoyo recibido en los momentos malos y por el grandísimo ambiente de trabajo creado y por esas risas en los momentos de descanso.

También quisiera dar las gracias a todos mis amigos de Granada y, especialmente, a Pedro, Paqui, Tatán, Pitu, M^a del Mar, Miguel y Yolanda por su amistad, aun cuando no estemos en contacto, porque también son partícipes de un modo u otro de esta Tesis.

De una manera muy especial quiero agradecer a “mi familia” de Madrid, Encarna, Antonio, Raquel y Carlos el haberme recibido y tratado como uno más de ellos, durante estos años que llevo en Madrid y, especialmente, en ese primer año que llegué de Granada.

También agradezco a Antonio, Modesta y Cati el cariño recibido por su parte.

Espero que mi memoria no me juegue una mala pasada y no haber olvidado a alguien en estos agradecimientos, si así fuera le pido mis más sinceras disculpas.

Este trabajo se lo dedico a mis padres, por haberme apoyado en todo momento, incluso en aquellas ocasiones en las que suponía estar bastante tiempo alejados y, principalmente, por haberme dado todo su cariño y amor. Pido disculpas si en algún momento no os he atendido como os merecíais, solo quiero que sepáis que estoy orgulloso de tener unos padres como vosotros. También se lo dedico a mis hermanos/as Charo, Pepi, David y Raúl, por hacer que exista una familia tan estupenda y unida y por darme su apoyo y aliento en todo momento, y a mis cuñados/a Eduardo, Ramón y Eva, y a mis sobrinos Eduardo,, Alejandro, Ramón, Laura y Eva María por hacerme la vida más feliz. A todos, de corazón, OS QUIERO.

Te lo dedico a ti, “Francis”, por tu apoyo durante la escritura de esta Tesis y, sobre todo, por el cariño y amor que me das y por cual me siento tan feliz. Te Quiero.

Juan María, Abril de 2007

Índice General

Resumen.

Objetivos y Plan de Trabajo.

1. Introducción.	1
1.1. El vino.	1
1.2. Elaboración del vino.	1
1.2.1. Vinificación en blanco.	1
1.2.1.1. Recepción, despalillado y estrujado de la uva.	1
1.2.1.2. Prensado y desfangado.	1
1.2.1.3. Encubado y fermentación alcohólica.	2
1.2.1.4. Trasiego, clarificación y estabilización.	2
1.2.2. Vinificación en tinto.	4
1.2.2.1. Recepción, despalillado y estrujado de la uva.	4
1.2.2.2. Maceración con orujos y fermentación alcohólica (Encubado).	4
1.2.2.3. Descube, prensado y final de la fermentación.	4
1.2.2.4. Fermentación maloláctica.	5
1.2.2.4.a. Algunos aspectos positivos de la fermentación maloláctica.	5
1.2.2.4.b. Algunos aspectos negativos de la fermentación maloláctica.	5
1.2.2.5. Trasiego, clarificación y estabilización.	6
1.2.2.6. Envejecimiento del vino.	6
1.2.3. Elaboración de vinos espumosos.	8
1.2.3.1. Tiraje.	9
1.2.3.2. Rima.	10
1.2.3.3. Punta.	10
1.2.3.4. Degüelle.	10
1.3. La fracción nitrogenada del vino.	14
1.3.1. Aminoácidos libres.	14

1.3.1.1. Evolución de los aminoácidos libres durante la fermentación alcohólica.	15
1.3.1.2. Evolución de los aminoácidos libres en el vino durante la fermentación maloláctica.	16
1.3.1.3. Evolución de los aminoácidos libres en vinos espumosos y vinos envejecidos sobre lías.	17
1.3.2. Aminas biógenas.	19
1.3.3. Péptidos.	24
1.3.3.1. Análisis, aislamiento y caracterización de los péptidos.	24
1.3.3.2. Evolución de los péptidos en el vino durante la fermentación alcohólica.	27
1.3.3.3. Evolución de los péptidos en el vino durante la fermentación maloláctica.	27
1.3.3.4. Evolución de los péptidos en los vinos espumosos y en los vinos envejecidos sobre lías.	28
1.3.4. Proteínas.	31
1.4. Propiedades de los péptidos.	34
1.4.1. Propiedades físico-químicas.	34
1.4.2. Propiedades sensoriales.	35
1.4.3. Propiedades funcionales.	36
1.4.3.1. Actividad antimicrobiana.	37
1.4.3.2. Actividad antioxidante.	37
1.4.3.3. Actividad antihipertensiva.	38
1.5. Cromatografía de líquidos de alta temperatura.	47
1.5.1. Antecedentes.	48
1.5.2. Ventajas de la HTLC sobre la HPLC convencional.	48
1.5.3. Comportamiento de la fase móvil en HTLC.	51
1.5.4. Modificaciones de un equipo de HPLC para operar a altas temperaturas.	53
1.5.5. Aspectos a controlar debidos a la temperatura.	54
1.5.6. Columnas de cromatografía de líquidos de alta temperatura.	55

1.5.7. Bioensayos acoplados a la HTLC.	58
2. Materiales y Métodos.	61
2.1. Muestras.	61
2.1.1. Vino tinto de la variedad Tempranillo.	61
2.1.2. Vinos espumosos de las variedades Malvar y Albillo.	62
2.1.3. Vinos comerciales.	63
2.1.4. Autolisado de levaduras.	63
2.2. Determinaciones Cuantitativas.	64
2.2.1. Cuantificación del nitrógeno total.	64
2.2.2. Cuantificación del nitrógeno de compuestos nitrogenados de alto peso molecular.	64
2.2.3. Cuantificación del nitrógeno de los aminoácidos libres.	64
2.2.4. Cuantificación del nitrógeno de los aminoácidos libres más péptidos.	64
2.2.5. Cuantificación del nitrógeno de péptidos.	65
2.2.5.1. Estudio de la fracción nitrogenada.	65
2.2.5.2. Estudio de la bioactividad.	65
2.2.6. Análisis de aminoácidos libres por cromatografía de líquidos de alta eficacia.	65
2.2.7. Análisis de aminoácidos totales por cromatografía de líquidos de alta eficacia.	66
2.2.8. Análisis de aminas biógenas por cromatografía de líquidos de alta eficacia.	67
2.3. Aislamiento y caracterización de la fracción peptídica.	68
2.3.1. Concentración de la muestra.	68
2.3.2. Fraccionamiento del concentrado por cromatografía de líquidos en columna abierta (Sephadex LH-20). Obtención de la fracción de peso molecular menor de 4000 Da.	69
2.3.3. Fraccionamiento de la fracción menor de 4000 Da por cromatografía de líquidos en columna abierta (Cosmosil 140 C ₁₈ -OPN).	70
2.3.4. Fraccionamiento por cromatografía de líquidos de alta eficacia semipreparativa en fase inversa.	71

2.3.5. Análisis de péptidos por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC).	71
2.4. Análisis de monosacáridos constituyentes de polisacáridos por cromatografía de gases.	73
2.5. Análisis Estadísticos.	73
2.6. Esquema del fraccionamiento de los vinos para el estudio de la fracción peptídica.	73
2.7. Evaluación de las bioactividades de las muestras estudiadas.	75
2.7.1. Determinación de la actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA).	75
2.7.2. Determinación de la actividad antioxidante.	77
2.8. Cromatografía de líquidos de alta temperatura.	78
2.8.1. Sistema cromatográfico de cromatografía líquida de alta temperatura.	78
2.8.2. Empaquetamiento de columnas.	80
2.8.3. Optimización del método de separación mediante HTLC.	81
2.8.4. Ensayo Bioquímico de la Catepsina B.	82
2.8.4.1. Sistema HTLC.	82
2.8.4.2. Ensayo bioquímico en línea.	82
2.8.5. Ensayo Bioquímico de la ECA.	84
2.8.5.1. Sistema HTLC.	84
2.8.5.2. Ensayo bioquímico en línea.	85
2.8.6. Ensayo de bioactividad en un autolisado de levadura vínica mediante HTLC-MS modificado.	86
2.8.6.1. Preparación de autolisado de levadura.	86
2.8.6.2. Detección en línea.	87
3. Resultados y Discusión.	91
3.1. La fracción nitrogenada de vinos tintos envejecidos con y sin lías.	91

3.1.1. Influencia de la fermentación maloláctica, de los tratamientos postfermentativos y del envejecimiento con y sin lías, sobre los compuestos nitrogenados de vinos tintos.	91
3.1.1.1. Variación del nitrógeno total, de los aminoácidos libres y de las aminas biógenas durante la fermentación maloláctica e influencia de los tratamientos de clarificación y estabilización.	91
3.1.1.2. Variación del nitrógeno total, de los aminoácidos libres y de las aminas biógenas durante el envejecimiento en barrica con o sin lías.	95
3.1.1.3. Variación de la fracción peptídica del vino durante la fermentación maloláctica e influencia del envejecimiento con y sin lías.	112
3.1.1.3.a. Fraccionamiento de los péptidos.	113
3.1.1.3.b. Evolución y composición de los péptidos más polares.	114
3.1.1.3.c. Evolución y composición de los péptidos menos polares.	117
3.1.1.3.d. Composición en monosacáridos de los polisacáridos de las fracciones peptídicas.	121
3.1.1.4. Resumen de los principales resultados obtenidos del estudio de la fracción nitrogenada de los vinos tintos.	123
3.2. La fracción nitrogenada de vinos espumosos.	125
3.2.1. Influencia de la variedad de uva, de la segunda fermentación, de la cepa de levadura y del envejecimiento con las levaduras sobre los compuestos nitrogenados de vinos espumosos elaborados por el método tradicional.	125
3.2.1.1. Variación del nitrógeno total, del nitrógeno de alto peso molecular y de los aminoácidos libres.	125
3.2.1.2. Variación de la fracción peptídica durante la segunda fermentación y el envejecimiento con las levaduras.	137
3.2.1.2.a. Fraccionamiento de los péptidos.	138
3.2.1.2.b. Evolución y composición de los péptidos más polares.	138
3.2.1.2.c. Evolución y composición de los péptidos menos polares.	141
3.2.1.2.d. Composición en monosacáridos de los polisacáridos de las fracciones peptídicas.	145

3.2.1.3. Resumen de los principales resultados obtenidos del estudio de la fracción nitrogenada de vinos espumosos de la D.O. Vinos de Madrid.	147
3.3. Bioactividad de los péptidos del vino.	148
3.3.1. Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina en vinos comerciales.	148
3.3.2. Caracterización de las fracciones con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina en vinos tintos. Influencia de la fermentación maloláctica y del envejecimiento en barrica con lías.	149
3.3.2.1. Actividad inhibitoria de la ECA de las muestras completas.	149
3.3.2.2. Actividad inhibitoria de la ECA de las fracciones obtenidas por cromatografía de líquidos en una columna abierta de Cosmosil 140 C ₁₈ -OPN.	150
3.3.2.3. Fraccionamiento de las fracciones obtenidas del Cosmosil 140 C ₁₈ -OPN por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa semipreparativa. Estudio de dichas fracciones.	154
3.3.3. Caracterización de las fracciones con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina en vinos espumosos. Influencia de la segunda fermentación y del envejecimiento con las levaduras.	158
3.3.3.1. Actividad inhibitoria de la ECA de las muestras completas.	158
3.3.3.2. Actividad inhibitoria de la ECA de las fracciones obtenidas por cromatografía de líquidos en una columna abierta de Cosmosil 140 C ₁₈ -OPN.	159
3.3.3.3. Fraccionamiento de las fracciones obtenidas del Cosmosil 140 C ₁₈ -OPN por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa semipreparativa. Estudio de dichas fracciones.	162
3.3.4. Bioactividad en un autolisado de levaduras en un medio vínico modelo.	164
3.3.4.1. Evolucion de los compuestos nitrogenados liberados por una cepa de <i>S. cerevisiae</i> bajo autolisis acelerada.	164
3.3.4.2. Fraccionamiento de los péptidos presentes en el autolisado de levaduras.	165
3.3.4.3. Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina del autolisado de levaduras.	167
3.3.4.4. Actividad antioxidante del autolisado de levaduras	171

3.3.5. Resumen de los principales resultados obtenidos del estudio de la bioactividad de los péptidos del vino.	174
3.4. Desarrollo de un método de cromatografía de líquidos de alta temperatura para el estudio on-line de compuestos bioactivos.	175
3.4.1. Optimización del método de separación mediante HTLC.	175
3.4.1.1. Composición de la fase móvil.	175
3.4.1.2. Estabilidad térmica del relleno de la columna.	176
3.4.1.3. Temperatura de la columna	178
3.4.1.3.a. Influencia de la temperatura sobre la retención cromatográfica.	178
3.4.1.3.b. Influencia de la temperatura sobre la concentración de disolvente orgánico.	178
3.4.1.4. Velocidad del flujo de la fase móvil.	181
3.4.2. Estudio de la bioactividad mediante acoplamiento de HTLC con ESI-MS en flujo continuo.	182
3.4.2.1. Estudio de la bioactividad de la catepsina B mediante acoplamiento de HTLC con ESI-MS en flujo continuo.	182
3.4.2.1.a. Estudio de la influencia del gradiente de temperatura sobre el ensayo de la bioactividad, de la catepsina B, en continuo.	185
3.4.2.1.b. Sensibilidad del sistema en el ensayo bioquímico con catepsina B.	187
3.4.2.2. Estudio de la bioactividad de la ECA mediante acoplamiento de HTLC con ESI-MS en flujo continuo.	189
3.4.2.3. Ensayo de bioactividad de inhibidores de la ECA en un autolisado de levadura vínica.	191
3.4.3. Resumen de los principales resultados obtenidos del desarrollo de un método de cromatografía de líquidos de alta temperatura para el estudio on-line de compuestos bioactivos.	192
4. Conclusiones.	197
5. Bibliografía.	201

Resumen

RESUMEN

Se están introduciendo en las bodegas distintas prácticas enológicas dirigidas a obtener vinos más complejos desde el punto de vista sensorial y, a su vez, diferentes de otros vinos existentes en el mercado. Entre ellas, destacan la realización de la fermentación maloláctica de los vinos tintos en la bodega en la que se va a realizar el envejecimiento y el envejecimiento con las lías de las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Estas tecnologías no están exentas de riesgos por la posible formación de compuestos indeseables como las aminas biógenas y la aparición de péptidos que pueden dar lugar a sabores desagradables en los vinos.

Por otra parte, la Denominación de Origen Vinos de Madrid está interesada en potenciar la producción de vinos espumosos de las variedades Albillo y Malvar para incrementar la diversidad de los vinos que produce. No se han encontrado estudios sobre la influencia de los métodos de producción de estos vinos tintos sobre la composición en aminoácidos libres y la formación de aminas biógenas de los mismos y al no existir ningún estudio sobre la fracción peptídica de los vinos tintos, ni sobre los vinos espumosos de las dos variedades anteriormente citadas, se ha planteado, en una primera parte, el estudio de la evolución de estos compuestos durante el proceso de elaboración de estos.

Por otro lado, en los últimos años se han dedicado muchos estudios a la búsqueda y caracterización de péptidos bioactivos en diversos alimentos. Sin embargo, a este tema se le ha prestado muy poca atención en el caso del vino. Tan solo existe un trabajo en la literatura sobre la determinación de actividad antihipertensiva, concretamente de actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina de los péptidos del vino, sin haber quedado claro el origen ni las causas de la modificación, en los diferentes tipos de vino, de dicha bioactividad de unos vinos a otros o durante la fermentación alcohólica. Debido a esto, en la segunda parte de esta tesis doctoral, para conocer un poco mejor la relación entre los compuestos peptídicos del vino y la bioactividad de los mismos, se ha llevado a cabo este estudio.

Por último, debido a las conocidas ventajas de la cromatografía de líquidos de alta temperatura (HTLC) para la detección y cuantificación “on-line” de actividades enzimáticas, se ha diseñado un método de HTLC que permite dicha determinación. En primer lugar ha sido necesario optimizar las variables asociadas a la cromatografía de líquidos de alta temperatura para, posteriormente, abordar la optimización de las variables que afectan a las reacciones enzimáticas objeto de estudio.

De los resultados obtenidos en el estudio de la fracción nitrogenada de los vinos tintos y de los vinos espumosos se puede concluir, con relación a los vinos tintos, que solo existe una ligera reducción en el contenido de aminoácidos libres durante la fermentación maloláctica y que durante el envejecimiento de los vinos con lías, se liberan aminoácidos por autólisis de levaduras y bacterias. Esta liberación de aminoácidos es más pronunciada en vinos envejecidos con lías, de modo que es necesario tomar precauciones en estos casos, puesto que el riesgo de formación de aminas biógenas se incrementa debido a la actividad descarboxilasa residual de las bacterias ácido lácticas responsables de la fermentación maloláctica. Los resultados obtenidos indican que si se aplica este tipo de tecnología para la elaboración de vinos tintos, la cual incrementa la complejidad de los mismos, se necesita seleccionar una cepa de bacteria ácido láctica que no produzca aminas biógenas para asegurarnos que no se formen estas aminas. Además, la fracción peptídica de estos vinos, es muy compleja, estando formada, al menos en parte, por glicopéptidos procedentes de las uvas y de las levaduras. Durante la fermentación maloláctica y el envejecimiento en barricas se producen cambios importantes, mayores en los vinos que envejecen con las lías. Los monosacáridos procedentes de polisacáridos más abundantes encontrados han sido glucosa y arabinosa, las cuales proceden de la uva y, en concentraciones bajas, la manosa, que procede de las levaduras.

Con relación a los vinos espumosos, la composición nitrogenada se ve fuertemente influenciada por la variedad de uva, mientras que el tiempo de envejecimiento en botella tiene una menor repercusión, presentando poca relevancia el tipo de cepa de levadura utilizada. La fracción peptídica de esos vinos, es igualmente compleja, y también presenta compuestos glicopeptídicos procedentes tanto de las uvas como de las levaduras. Los monosacáridos procedentes de polisacáridos más abundantes encontrados en estos vinos, igual que para los vinos tintos, han sido la glucosa y arabinosa, estando, en este caso, en concentraciones altas la manosa, la cual procede de las levaduras.

Por otro lado, los vinos que presentan una mayor actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), son los vinos tintos. Con relación al estudio de estos vinos durante el envejecimiento, se ha demostrado que la actividad IECA aumenta durante el mismo, debido, entre otros factores, a la liberación de péptidos más activos. Sin embargo, esta actividad disminuye, durante el envejecimiento, cuando se relaciona con el contenido peptídico. De las fracciones peptídicas obtenidas de estos vinos, los más activos se encuentran en la fracción menos polar. En los vinos espumosos estudiados se ha encontrado el mismo comportamiento que en los vinos tintos, presentando, de nuevo, la fracción menos polar, la mayor actividad IECA

en función del contenido peptídico. Se han propuesto cuatro estructuras peptídicas (WVP, SFP, SWF y SPWR), con actividad IECA, para los vinos tintos y una (DPPPWG) para los vinos espumosos, que se encuentran formando glicopéptidos

Los péptidos menos polares, obtenidos por autólisis de levaduras en un medio vínico modelo, al igual que en los casos anteriores, han presentado la mayor actividad IECA al relacionarla con el contenido peptídico. El mismo comportamiento se ha encontrado para la actividad antioxidante, lo cual indica que los compuestos peptídicos menos polares liberados por las levaduras presentan bioactividad multifuncional.

Por último, la optimización del sistema de cromatografía líquida de alta temperatura para la separación de muestras complejas se ha realizado mediante el estudio de la influencia de la composición de la fase móvil, estabilidad térmica del relleno de la columna, temperatura de la columna y velocidad del flujo de la fase móvil sobre la separación cromatográfica. Posteriormente, una vez optimizado el sistema, se ha estudiado la bioactividad, mediante el acoplamiento en línea de HTLC con ESI-MS, de dos enzimas diferentes (catepsina B y ECA) bajo diferentes condiciones y se ha comprobado la viabilidad del sistema para el ensayo enzimático acoplado. Los resultados obtenidos con las muestras estudiadas son esperanzadores, pudiéndose pensar que permitirán la caracterización bioquímica de inhibidores de enzimas presentes en muestras complejas.

Este trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **J.M. Alcaide-Hidalgo**, M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo, E. Pueyo. "Partial characterization of peptides from red wines. Changes during malolactic fermentation and aging with lees". (2007). En preparación.
- **J.M. Alcaide-Hidalgo**, E. Pueyo, M.C. Polo, A.J. Martínez-Rodríguez. "ACE-inhibitory and antioxidant peptides released from wine yeast under accelerated autolysis". (2007), (Enviada).
- **J.M. Alcaide-Hidalgo**, M.V. Moreno-Arribas, P.J. Martín-Álvarez, M.C. Polo. "Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines". Food Chemistry, 2007, 103 (2), 572-581.
- M.A. Pozo-Bayón, **J.M. Alcaide**, M.C. Polo, E. Pueyo. "Angiotensin I converting enzyme inhibitory compounds in white and red wines". Food Chemistry, 2007, 100 (1), 43-47.
- A.R. de Boer, **J.M. Alcaide Hidalgo**, J.G. Krabbe, J. Kolkman, C.N. van Emde Boas, W.M.A. Niessen, H. Lingeman, H. Irth. "High-temperature liquid chromatography coupled on-line to a continuous-flow biochemical screening assay with electrospray ionization mass spectrometric detection". Analytical Chemistry. 2005, 77 (24): 7894-7900.
- E. Pueyo, **J.M. Alcaide-Hidalgo**, P.J. Martín-Álvarez, M.C. Polo, M.C. Fajardo, B. Simón, P. Hidalgo. "Elaboración de vinos espumosos de las variedades Albillo y Malvar con levaduras autóctonas de la D.O. Vinos de Madrid". Tecnología del Vino, 2005, 25, Julio-Agosto, pp 55-63.

SUMMARY

Different enological techniques are being introduced in the winery to obtain more complex wines from a sensorial point of view and different wines from those existing in the market. Among them, the malolactic fermentation of red wines in the barrel of aging and the aging with the lees from alcoholic and malolactic fermentations. These technologies are not free of risks by the possible undesirable compound formation like biogenic amines and the peptide appearance that can give rise to disagreeable flavors in wines. On the other hand, the Guarantee of Origin Vinos de Madrid is interested in promoting the foaming wine production of the varieties Albillo and Malvar to increase the diversity of the wines that is already producing. The influence of the methods of production of these red wines on the composition in free amino acids and the biogenic amines formation is not clear and the studies on the peptide fraction of red wines or on foaming wines of the two varieties previously mentioned, are also scanned. Thus, in the first part of this work has been considered the study of the evolution of these compounds during the process of elaboration of those wines.

On the other hand, in the last years many studies on the search and characterization of bioactives peptide from different food stuffs have been reported. However, only one work in the literature on the determination of antihypertensive activity, concretely the inhibitory angiotensin converting enzyme (IACE) activity of the peptides of the different types of wine has been reported, although without to the origin and the causes of the modification of this bioactivity between the different wines or during the alcoholic fermentation remains unclear. Thus, the second part of this manuscript is denoted to the possible relationship between peptide compounds of wine and its bioactivity.

Finally, for the detection and quantification "on-line" of enzymatic activities, a chromatography of liquids of high temperature (HTLC) method has been designed, due to the well-known advantages of the HTLC that allows this determination. Firstly, the variables associated to the chromatography of liquids of high temperature were optimized and then the optimization of the variables that affect to the enzymatic reactions were carried out.

From the results obtained in the study of the nitrogen fraction of red wines and foaming wines it is possible to conclude that a slight reduction in the content of free amino acids exists, in red wines, during the malolactic fermentation and that during the aging of wines with lees, free amino acids from the autolysis of yeasts and bacteria are released. This liberation of amino acids

is more pronounced in aged wine with lees, since the risk of biogenic amines formation is increased due to the residual decarboxylase activity of the lactic acid bacteria (LAB) in charge of the malolactic fermentation. Thus if this type of technology is applied to the red wine elaboration, which increase the complexity of the wine, it is needed to select a strain of LAB that does not produce biogenic amines. In addition, the peptide fraction of these wines, is very complex, being formed, at least partial, by glycopeptides arising from the grapes and yeasts. During the malolactic fermentation and the aging in barrels important changes are taking place, more noticeable in wines aging with lees.

In relation to foaming wines, the nitrogen composition is strongly influenced by the variety of grape, whereas the time of aging in bottle has a less repercussion, presenting little relevance the type of used yeast strain. The peptide fraction of those wines, very complex as well, also presents glycopeptides compounds from grapes and yeasts.

On the other hand, the red wines present a greater IACE. During the aging of these wines, it has been demonstrated that IACE activity increases, due, among other factors, to the more active peptide liberation. Nevertheless, this activity decrease, during the aging, when it is related to the peptide content. In the fractions of these wines, the most active peptides were in the less polar fraction. Foaming wines presented the same behavior that red wines, displaying, again, the less polar fraction, greater IACE activity when related to the peptide content. Four IACE peptide sequences have been found (WVP, SFP, SWF and SPWR) in red wines and only one (DPPPWG) in foaming wines, in all cases as glycopeptides. The less polar peptides, obtained by autolysis of yeast in an basic vinic model, like in the previous cases, have presented greater activity IACE when it was related to the peptide content. The same behavior has been for the antioxidant activity, which indicates that the peptide compounds less polars released by yeast present multifunctional bioactivity.

Finally, the optimization of the system of HTLC for the separation of complex samples consisted in the study of the influence of the composition of the mobile phase, thermal stability of the material packing of the column, temperature of the column and speed of the flow of the mobile phase on the chromatographic separation. Once optimized the system, the bioactivity was studied by means of the connection *on line* of HTLC with ESI-MS, the used of two different enzymes (cathepsin B and ACE) under different conditions and the viability of the system for the connected enzymatic test was verified. The obtained results are hopeful, being able as it is possible to think

that they will allow enzyme the biochemical characterization of enzyme inhibitors in complex samples.

This work has given rise to the following publications:

- **J.M. Alcaide-Hidalgo**, M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo, E. Pueyo. "Partial characterization of peptides from red wines. Changes during malolactic fermentation and aging with lees". (2007). En preparación.
- **J.M. Alcaide-Hidalgo**, E. Pueyo, M.C. Polo, A.J. Martínez-Rodríguez. "ACE-inhibitory and antioxidant peptides released from wine yeast under accelerated autolysis". (2007), (Enviada).
- **J.M. Alcaide-Hidalgo**, M.V. Moreno-Arribas, P.J. Martín-Álvarez, M.C. Polo. "Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines". Food Chemistry, 2007, 103 (2), 572-581.
- M.A. Pozo-Bayón, **J.M. Alcaide**, M.C. Polo, E. Pueyo. "Angiotensin I converting enzyme inhibitory compounds in white and red wines". Food Chemistry, 2007, 100 (1), 43-47.
- A.R. de Boer, **J.M. Alcaide Hidalgo**, J.G. Krabbe, J. Kolkman, C.N. van Emde Boas, W.M.A. Niessen, H. Lingeman, H. Irth. "High-temperature liquid chromatography coupled on-line to a continuous-flow biochemical screening assay with electrospray ionization mass spectrometric detection". Analytical Chemistry. 2005, 77 (24): 7894-7900.
- E. Pueyo, **J.M. Alcaide-Hidalgo**, P.J. Martín-Álvarez, M.C. Polo, M.C. Fajardo, B. Simón, P. Hidalgo. "Elaboración de vinos espumosos de las variedades Albillo y Malvar con levaduras autóctonas de la D.O. Vinos de Madrid". Tecnología del Vino, 2005, 25, Julio-Agosto, pp 55-63.

Objetivos y Plan de trabajo

Presentación del trabajo

Existen numerosos estudios en la bibliografía dirigidos al conocimiento de la fracción nitrogenada de los vinos. Sin embargo, hay un grupo de compuestos, los péptidos, que han sido muy poco estudiados y muchos aspectos de la elaboración cuya repercusión en la calidad sanitaria y sensorial de los vinos no se conoce suficientemente. Entre ellos, el modo de llevar a cabo la fermentación maloláctica o el envejecimiento en bodega de los vinos tintos o la posibilidad de utilizar variedades de uva aún no estudiadas, para la elaboración de vinos espumosos diferentes de los existentes actualmente en el mercado.

Está descrita la presencia de péptidos con distintas actividades biológicas en los alimentos, sin embargo apenas existen estudios sobre estas actividades en los péptidos del vino. Debido a que los compuestos bioactivos de los alimentos están en muchas ocasiones, en pequeñas concentraciones y en el seno de mezclas complejas lo que conlleva largos procesos de separación y purificación, es necesario disponer de métodos que permitan su determinación sin necesidad de realizar purificaciones exhaustivas de los compuestos. Por ello se ha llevado a cabo esta investigación cuyo/s **PRINCIPAL/ES OBJETIVO/S** han sido:

- Profundizar en el conocimiento de la fracción nitrogenada de los vinos, especialmente, de la fracción peptídica.
- Determinar la existencia de péptidos bioactivos en vinos y en sistemas vínicos modelo e identificar dichos péptidos.
- Desarrollar un método de cromatografía de líquidos de alta temperatura que permita la determinación “on-line” de compuestos bioactivos.

Para conseguir estos objetivos se ha desarrollado el siguiente **PLAN DE TRABAJO**:

1. Estudio de la fracción nitrogenada de vinos tintos: Influencia de la realización de la fermentación maloláctica en depósito de acero o en bodega, del envejecimiento con y sin lías, de la agitación de las lías semanal o mensualmente y del tiempo de envejecimiento.
2. La fracción nitrogenada de vinos espumosos de la D.O. Vinos de Madrid. Influencia de la variedad de uva, de la cepa de levadura y del tiempo de envejecimiento.

3. Estudio de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) de los péptidos del vino. Influencia del tipo de vino y de la tecnología de elaboración.
4. Desarrollo de un método de cromatografía de líquidos de alta temperatura para el estudio on-line de compuestos bioactivos.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. El vino.

Según la Ley 24/2003, de 10 de Julio, de la Viña y del Vino, artículo 2, apartado e), “El vino es el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva”.

1.2. Elaboración del vino.

La vinificación es el conjunto de operaciones puestas en práctica para transformar en vino el jugo o mosto de uva. Antes de comenzar la vinificación de la uva, ésta tiene que madurar adecuadamente en la vid y posteriormente se realizará la vendimia. Una vez vendimiada se transporta a la bodega, en la cual sufre varios procesos. Existen diferentes procedimientos de vinificación que dan lugar a los diversos tipos de vinos. A continuación, se describe, brevemente, la elaboración de cada tipo de vino estudiado.

1.2.1. Vinificación en blanco.

El vino blanco es el que procede de uvas blancas o de uvas tintas con pulpa no coloreada y se elabora por fermentación del jugo de uva sin las partes sólidas del racimo. En la figura 1.2-1 se representa, esquemáticamente, el proceso de elaboración de un vino blanco. Se realiza en diferentes etapas.

1.2.1.1. Recepción, despalillado y estrujado de la uva.

La recepción se realiza en la tolva o en mesas de selección. La etapa de despalillado se suprime frecuentemente, puesto que los raspones facilitan el escurrido del mosto durante el prensado. Se realiza un estrujado, en el cual se rompe la uva por suave presión del grano.

1.2.1.2. Prensado y desfangado.

Consiste en la extracción por presión, del mosto contenido en la vendimia estrujada y escurrida. La presión debe ser de débil intensidad, para obtener un mosto de calidad. El desfangado o clarificación se realiza para limpiar el mosto antes de la fermentación. Se eliminan

partículas en suspensión, restos vegetales, partes sólidas de las uvas y partículas coloidales entre otras.

1.2.1.3. Encubado y fermentación alcohólica.

Esta etapa es muy importante desde el punto de vista cualitativo y aromático. Generalmente se realiza una siembra de levaduras. Durante la fermentación se forman, principalmente, etanol y dióxido de carbono a partir de los azúcares, debido a la acción de las levaduras. También se forman glicerol, ácido succínico y ácido acético, y otros productos secundarios como ácido láctico, butilenglicol, acetaldehído, ácido pirúvico, alcoholes superiores y otras sustancias en pequeñas cantidades, aunque importantes desde el punto de vista organoléptico. Esta fase es muy importante en la transformación del mosto en vino, debiéndose controlar, fundamentalmente, la temperatura y el contenido en azúcares fermentables al final de la fermentación. Se debe intentar realizarla a una temperatura de, aproximadamente, 20 °C y no alcanzar los 30-32 °C, para evitar una parada de la fermentación. En general, la fermentación maloláctica, de la que se hablará en la elaboración del vino tinto, no se realiza en la elaboración de blancos, aunque en ocasiones es necesaria cuando el vino presenta alta acidez y especialmente, un contenido en ácido málico excesivo.

1.2.1.4. Trasiego, clarificación y estabilización.

Concluida la fermentación, se realiza el trasiego para clarificar y prevenir o eliminar olores azufrados. La clarificación también se realiza mediante la adición de sustancias clarificantes que arrastran los restos sólidos y sustancias solubles pero inestables al fondo del recipiente. Posteriormente, para eliminar las partículas sólidas que hayan podido quedar, se realiza la filtración del vino. La estabilización del vino se realiza para prevenir los diferentes tipos de precipitaciones en el seno del mismo.

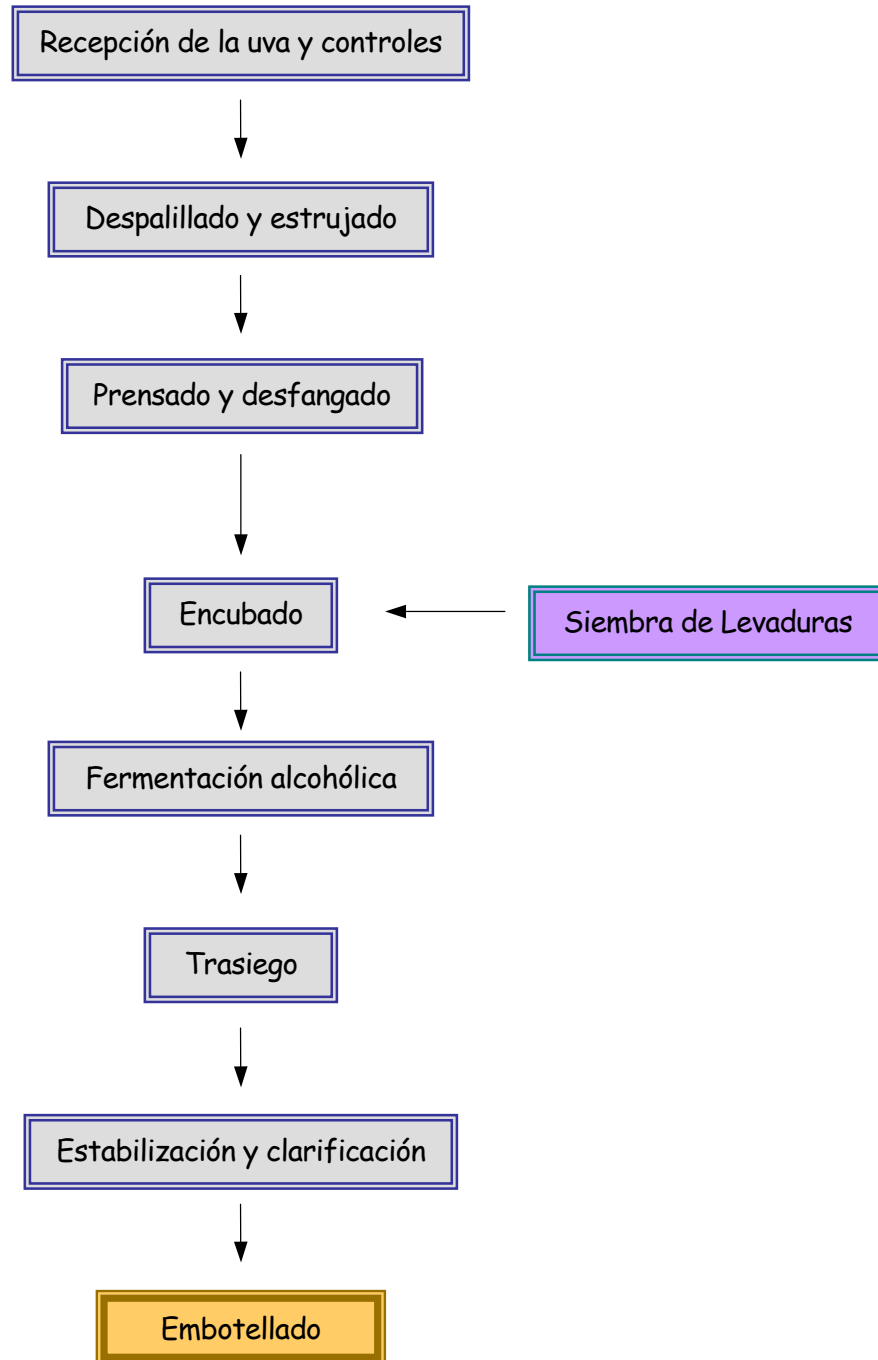
ELABORACIÓN DE VINOS BLANCOS

Figura 1.2-1. Proceso de elaboración de vinos blancos.

1.2.2. Vinificación en tinto.

El vino tinto es el que procede de mostos de uvas tintas y se elabora de forma que se difunda al vino la materia colorante contenida en los hollejos. En la figura 1.2-2 se representa el proceso de elaboración de vinos tintos. Se desarrolla en diferentes etapas, algunas de las cuales son similares a las de la elaboración del vino blanco:

1.2.2.1. Recepción, despalillado y estrujado de la uva.

La recepción de la uva se realiza en la tolva o en mesas de selección, al igual que en la elaboración de vinos blancos. Por el contrario, la etapa de despalillado se realiza siempre y su objetivo es evitar que se transmitan olores y sabores herbáceos desagradables al vino durante la maceración, puesto que en la elaboración de vinos tintos no se produce la etapa de prensado anterior a la maceración. Durante el estrujado se rompe la uva por presión del grano y comienza el proceso de maceración.

1.2.2.2. Maceración con orujos y fermentación alcohólica (Encubado).

Una vez que se ha encubado el vino, se realiza, en algunas ocasiones, la siembra de levaduras. En la maceración se produce la extracción de los compuestos fenólicos y otras sustancias, en menor proporción, procedentes de los hollejos y de las pepitas. La etapa de fermentación es similar a la de la elaboración del vino blanco y en ella se forman principalmente etanol y dióxido de carbono, a partir de azúcar, debido a la acción de las levaduras. Esta etapa es muy importante en la elaboración del vino y es muy compleja. Se debe controlar la temperatura y realizarse entre 28 y 30 °C.

1.2.2.3. Descube, prensado y final de la fermentación.

Una vez conseguida la extracción deseada de los compuestos fenólicos durante la maceración, se trasiega el líquido para separarlo de las materias sólidas. A los hollejos se les realiza un prensado dando lugar al vino de prensa. El descube puede realizarse unos días antes de finalizar la fermentación alcohólica, coincidiendo con ésta o después de que haya finalizado.

1.2.2.4. Fermentación maloláctica.

Es la transformación del ácido málico en ácido láctico por la acción de las bacterias lácticas produciéndose una disminución de la acidez total. Desde un punto de vista bioquímico el término “fermentación” es incorrecto ya que esta transformación no es un proceso fermentativo, sin embargo se usa normalmente en la literatura. Los factores principales que determinan que se produzca esta transformación son la temperatura, cuyo óptimo para las bacterias es de 21-24 °C y el pH, el cual tiene un óptimo para estos microorganismos sobre 4,2-4,5, el cual es muy superior a los valores del vino, con lo cual el límite ideal de pH está entorno a 3,2. La fermentación maloláctica es un proceso que aunque presenta ventajas, también puede tener efectos negativos en la calidad del vino.

1.2.2.4.a. Algunos aspectos positivos de la fermentación maloláctica.

- ✦ Importante disminución de la acidez total del vino, dando lugar a la desaparición de sensaciones gustativas ásperas y astringentes propias del ácido málico, y a la aparición de gustos más vinosos y suaves debido al ácido láctico.
- ✦ Acumulación de manoproteínas en el vino, procedentes de las paredes celulares de las levaduras en autólisis y de las propias bacterias lácticas, las cuales, solas o polimerizadas con los taninos, dan lugar a una agradable sensación grasa y de volumen en boca.
- ✦ Mayor estabilidad biológica del vino, puesto que se produce una disminución en la cantidad de nutrientes y un aumento en el número de inhibidores microbianos (bacteriocinas) que dan estabilidad al vino frente a otras alteraciones producidas por los microorganismos.

1.2.2.4.b. Algunos aspectos negativos de la fermentación maloláctica.

- ✦ Incremento de la acidez volátil, por degradación de azúcares residuales y especialmente por la metabolización del ácido cítrico.
- ✦ Disminución de la intensidad de color en vinos tintos, debido a la modificación o transformación de los antocianos.

- ✦ Modificación del aroma del vino, por disminución de los aromas varietales o primarios procedentes de la uva, por desaparición de sustancias aromáticas procedentes de la fermentación alcohólica y formación de compuestos que presenten aromas negativos para el vino.
- ✦ Degradación de los aminoácidos libres del vino, por descarboxilación, dando lugar a aminas biógenas, algunas de las cuales son tóxicas especialmente para personas sensibles.
- ✦ Eventual formación de polisacáridos exocelulares, los cuales confieren al vino un aspecto denso y viscoso, conocido como enfermedad de la grasa o ahilado.

1.2.2.5. Trasiego, clarificación y estabilización.

Concluidas las fermentaciones, el vino se somete a diversos trasiegos y tratamientos de clarificación y estabilización por diferentes métodos o técnicas. En algunos casos, este vino es embotellado para salir al mercado como vino joven.

1.2.2.6. Envejecimiento del vino.

La crianza, se realiza, generalmente, en dos etapas. La primera se realiza en depósitos de madera (barricas), en condiciones oxidativas y la segunda en botella, en condiciones reductoras. El periodo de tiempo mínimo transcurrido en las etapas de bodega y de botella está reglamentado por los distintos organismos reguladores. Durante la crianza se modifican y mejoran las características organolépticas del vino. El envejecimiento en bodega da lugar a la evolución del vino, dándose en ésta fenómenos oxidativos por entrada de oxígeno a través de la madera, produciendo fenómenos de polimerización entre antocianos y taninos que dan lugar a una modificación de los compuestos fenólicos, dando al vino estabilidad y mejores propiedades organolépticas, por una pérdida de astringencia, modificando el color y las propiedades gustativas. En la crianza, también, se produce la disolución de componentes propios de la madera (compuestos volátiles que contribuyen al aroma, fenoles, etc.). Durante la crianza en botella se producen modificaciones de los constituyentes del vino que contribuyen, normalmente, a una mejora organoléptica del mismo.

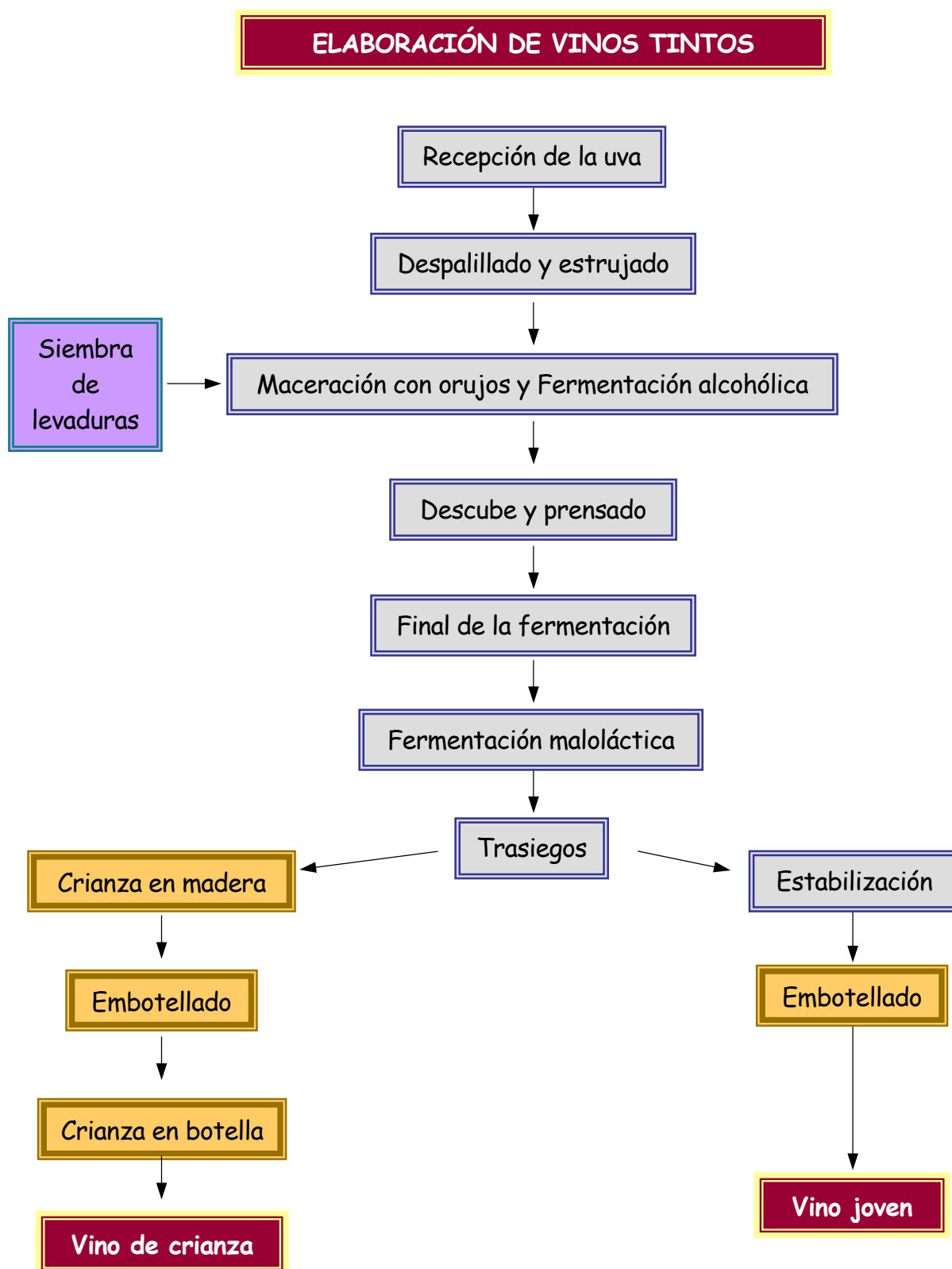


Figura 1.2-2. Proceso de elaboración de vinos tintos.

1.2.3. Elaboración de vinos espumosos.

Los vinos espumosos naturales, según la Orden del 27 de Julio de 1972 (B.O.E. de 8 de Agosto de 1972) por la que se reglamentan los vinos espumosos naturales y los vinos gasificados, son “aquellos vinos procedentes de uvas de variedades adecuadas, que contienen, como consecuencia de su especial elaboración, gas carbónico de origen endógeno y que al ser descorchada la botella y escanciado el vino forma espuma de sensible persistencia, seguida de un desprendimiento continuo de burbujas. El gas carbónico habrá de proceder de una segunda fermentación, realizada en envase herméticamente cerrado, de azúcares naturales del vino base o azúcares agregados y el producto terminado deberá tener una presión mínima de cuatro atmósferas, medida a 20 °C”.

Según la elaboración de los vinos espumosos, estos se clasifican en espumosos elaborados en botella y espumosos fermentados en grandes envases o granvás. Granvás es el espumoso natural, cuya segunda fermentación se realiza en grandes envases o depósitos de cierre hermético, de los que se transvasa a botellas para su comercialización. El tiempo mínimo de permanencia del vino con las levaduras antes de salir al mercado es de veintiún días. En los vinos espumosos fermentados en botella, todo el proceso de fermentación y crianza, el cual se debe efectuar en cavas o locales de condiciones térmicas adecuadas durante, al menos dos meses, se realiza en la propia botella, pudiendo ser trasvasado el vino, posteriormente, para efectuar la eliminación de las lías.

Por otro lado, los vinos espumosos elaborados por el método clásico o tradicional, deben efectuar el proceso de elaboración y crianza, desde la segunda fermentación hasta la eliminación de las lías inclusive, en la misma botella en la que se ha realizado el tiraje.

Los vinos espumosos naturales se denominan, en función de su riqueza en azúcares, como:

- ☐ Seco o sec: De 0 a 30 g/L de materias reductoras.
- ☐ Semiseco o semidulce: De 30 a 50 g/L de materias reductoras.
- ☐ Dulce: Más de 50 g/L de materias reductoras.

Aquellos vinos espumosos naturales con materias reductoras en cantidad inferior a 20 g/L pueden denominarse con la calificación de bruto o “brut”.

Las principales etapas de la elaboración de los vinos espumosos por el método tradicional se muestran en la figura 1.2-3.

1.2.3.1. Tiraje.

Es el llenado de la botella con el vino base (vino elaborado según la metodología de elaboración de un vino blanco) y la adición de una solución que se denomina “licor de tiraje”. La adición deberá efectuarse en el momento del tiraje en la botella o llenado del gran envase, o poco antes, a fin de que no comience la fermentación alcohólica de forma apreciable en depósito abierto. El vino base suele ser una mezcla de vinos monovarietales en proporciones adecuadas para obtener una calidad determinada. Debe presentar ciertas características organolépticas (color pálido, aroma afrutado, etc.) y analíticas (concentración de oxígeno suficiente para el desarrollo de las levaduras, poco contenido en azúcar residual, contenido en alcohol moderado, y una baja acidez volátil). Una vez introducido en la botella no se le podrá hacer ningún otro tratamiento.

El vino base utilizado en el tiraje habrá de tener las siguientes características analíticas:

- ☞ Graduación alcohólica: 9,5-11,5 % vol.
- ☞ Acidez total (en ácido sulfúrico): 3,5-6 g/L
- ☞ Extracto seco no reductor: 12,5-20 g/L
- ☞ Acidez volátil real (en ácido acético) < 700 mg/L
- ☞ SO₂ libre < 20 mg/L
- ☞ SO₂ total < 170 mg/L

El licor de tiraje es una solución formada por levaduras y sacarosa en proporción adecuada para que la segunda fermentación produzca la presión de dióxido de carbono deseado. La cantidad máxima de sacarosa que puede ser fermentada será de 25 gramos por litro de vino base. Además, se suele añadir una pequeña cantidad de bentonita con el objetivo de facilitar la floculación y posterior eliminación de las levaduras.

1.2.3.2. Rima.

Las botellas se colocan en posición horizontal en locales de crianza especialmente habilitados para ello, llamados “cavas”. Durante esta etapa se producirá la segunda fermentación, toma de espuma y crianza (envejecimiento con las levaduras). La legislación española establece que el vino deberá permanecer en esta etapa como mínimo nueve meses.

1.2.3.3. Punta.

En esta etapa las botellas se someten a un proceso de removido, para conseguir que todo el sedimento se dirija al cuello de la misma. Este proceso que se hacía tradicionalmente colocando las botellas sobre pupitres, girándolas manualmente un octavo de vuelta cada día, durante quince días hasta que quedaban prácticamente perpendiculares al suelo, ha sido sustituido, en la actualidad, por sistemas más o menos automatizados que permiten manipular un conjunto de botellas de una sola vez.

1.2.3.4. Degüelle.

Consiste en la eliminación de las lías, depositadas en el cuello de la botella. En la actualidad, este depósito se elimina congelando el cuello de la botella al introducirla en un baño criogénico. A continuación, se invierte y se le quita el tapón y por la propia presión interna, el depósito congelado se expulsa.

Si se emplean levaduras incluidas o inmovilizadas en bolitas de alginato cálcico o dentro de un cartucho que se coloca en el cuello de la botella, se evita la etapa de punta y se facilita el degüelle, pues no es necesario la congelación del cuello de la botella con las lías.

Durante la etapa de degüelle, el vino debe quedar perfectamente brillante, sin muestra de sedimento alguno después de realizar esta operación. Se pueden producir pérdidas de vino, las cuales se compensan con la adición, hasta restablecer el volumen inicial, del licor de expedición, que puede ser el propio vino espumoso o bien una disolución de sacarosa, mosto de uva, mosto de uva parcialmente fermentado, o mosto de uva concentrado rectificado o no, vino base o una mezcla de dichos productos, con adición en su caso de destilados de vino. Por último, se cierra la botella con el tapón definitivo, el cual se sujeta al cuello de ésta con el bozal o morrión.

Los vinos espumosos naturales, terminada su elaboración, deberán tener las siguientes características analíticas:

- ☞ Graduación alcohólica: 10,8-12,8 % vol.
- ☞ Acidez total (en ácido sulfúrico): 3,5-6 g/L
- ☞ Extracto seco no reductor: 12-20 g/L
- ☞ Acidez volátil real (en ácido acético) < 800 mg/L
- ☞ SO₂ libre < 20 mg/L
- ☞ SO₂ total < 170 mg/L
- ☞ Presión de CO₂ (a 20 °C) > 4 atm

ELABORACIÓN DE VINOS ESPUMOSOS

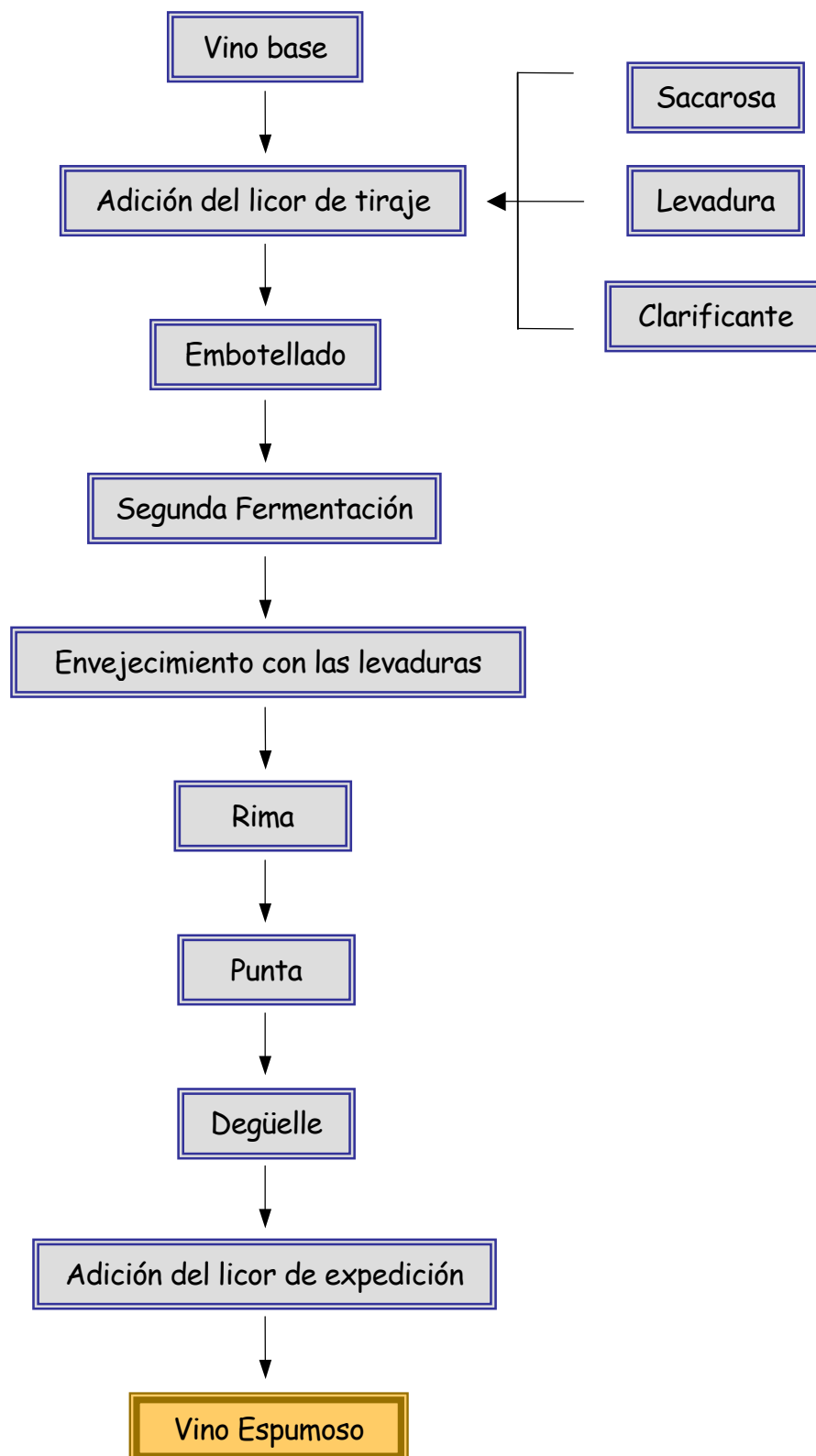


Figura 1.2-3. Esquema de elaboración de los vinos espumosos elaborados por el método tradicional.

En este tipo de elaboración, durante la etapa de envejecimiento con las levaduras, tiene lugar la autólisis de éstas. Se trata, por tanto, de un proceso biotecnológico, en el que las propiedades que presentan las cepas de levadura utilizadas pueden repercutir, tanto para facilitar las operaciones propias de esta elaboración, como para conferir al vino características organolépticas que influyan sobre su calidad. El término autólisis fue definido por Salkowsky en 1875 (Farrer, 1956) como el proceso de lisis o rotura celular causado por las propias enzimas de los microorganismos. El proceso que tiene lugar durante la autólisis de las levaduras se debe a que la pared celular, una vez muerta por falta de nutrientes y exceso de CO_2 en el medio, modifica su estructura, aumentando la permeabilidad, produciéndose una expulsión del contenido intracelular por ósmosis hacia el medio extracelular, manteniéndose la forma y la estructura celular de las levaduras.

La autólisis de levaduras del vino es un proceso complejo que depende de varias variables, y que se inicia inmediatamente después de la muerte celular, pero antes de que se detecten cambios en la composición química del vino. Está estimado que esto podría ocurrir a partir de los 6 meses de envejecimiento del vino en contacto con las lías de levaduras (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000a), aunque este tiempo puede variar en función de diferentes factores como la temperatura, presión, tipo de cepa de levadura, etc.

Las condiciones y el medio en que se realiza la segunda fermentación para la obtención de vinos espumosos por el método tradicional, determinan las características que deben reunir las cepas de levadura utilizadas. Entre otras, deben poseer una adecuada adaptación al vino base, manifestando una buena resistencia a cantidades relativamente elevadas de etanol (10-11% v/v), desarrollarse a pH bajo, ser resistentes a determinadas concentraciones de SO_2 , debido a la presencia generalizada de este antiséptico en el medio fermentativo, tener pocas exigencias nutricionales, capacidad de floculación (Bartrá, 1995) y capacidad autolítica y espumante (Martínez-Rodríguez y col., 2001). Además, deben de ser capaces de fermentar de forma completa los azúcares añadidos, a 16 °C o inferior, y resistir las altas presiones de CO_2 (5-6 atm) que de forma progresiva se generan en el interior de la botella, al desarrollarse la fermentación en un ambiente cerrado, conservando, en todo caso, suficiente vitalidad celular. En la actualidad, se están llevando a cabo estudios en los que se realizan modificaciones de las levaduras con la finalidad de producir autólisis aceleradas y ver como afectan estas modificaciones a las propiedades de los vinos (Nunez y col., 2005).

Feuillat y Charpentier (1982) comprobaron que en las condiciones en que se producen los vinos espumosos, a un pH ácido (entre 3 y 3,5), temperatura, generalmente, baja (entre 10 °C y 15 °C) y elevada concentración de etanol, no se inhibe el proceso de autólisis. Estas condiciones particulares de elaboración de los vinos espumosos permiten que el proceso se desarrolle durante periodos prolongados de tiempo, provocando una hidrólisis lenta de los componentes intracelulares de la levadura, que posteriormente serán liberados al vino.

La vinificación de los vinos espumosos por el método tradicional exige la realización de las operaciones de removido y degüelle con el fin de poder eliminar el depósito de levaduras originado tras la segunda fermentación, mediante destapado de las botellas, sin dejar residuos al final de la operación (Hidalgo, 1986). Por ello, constituye una gran ventaja tecnológica el poder floculante de las levaduras utilizadas (Suzzi y col., 1984), con el fin de facilitar las operaciones mencionadas anteriormente, reduciendo o eliminando el uso de coadyuvantes de floculación (Bartrá, 1995; Hidalgo, 1988). La utilización de estas levaduras permite reducir los costes de producción lo que redunda en una mejora económica del proceso y reducir perjuicios ocasionados por el coadyuvante al eliminar sustancias del seno del vino de forma no deseada.

1.3. La fracción nitrogenada del vino.

Las sustancias nitrogenadas que llegan a la uva son transportadas en formas simples, como los cationes amonio, los aminoácidos y los péptidos pocos polimerizados. Las proteínas se forman en el interior del grano de la uva a partir de estas sustancias. Durante todo el proceso de elaboración del vino se producen importantes cambios en esta fracción que van a afectar a la calidad del producto final.

La mayoría de los estudios realizados sobre la fracción nitrogenada de los mostos y de los vinos se han orientado al estudio de los aminoácidos libres. También hay abundante literatura sobre las aminas y las proteínas, sin embargo los péptidos han sido muy poco estudiados, principalmente, por las dificultades de su análisis.

1.3.1. Aminoácidos libres.

Se han identificado una veintena de aminoácidos en los mostos de uva, representando su nitrógeno, por término medio, del 28 al 39% del nitrógeno total, dependiendo de que se trate de mostos de uvas blancas o tintas respectivamente (Cáceres y col., 1987). El contenido en

aminoácidos libres aumenta durante la maduración de la uva, pudiendo llegar a ser el 90% del nitrógeno total en los mostos de uvas sobremaduras.

Los aminoácidos libres de los mostos tienen gran importancia debido a que son una fuente de nitrógeno para las levaduras en la fermentación alcohólica, para las bacterias en la fermentación maloláctica y porque pueden ser una fuente de compuestos aromáticos. En determinados casos, algunos aminoácidos pueden dar lugar a compuestos indeseables en el vino, como es el caso del carbamato de etilo, aminas biógenas, ocratoxina A (a partir de la 2-fenilalanina) y β -carbolinas (a partir del triptófano) (Herraiz y Ough, 1993a; Herraiz y col., 1993b).

1.3.1.1. Evolución de los aminoácidos libres durante la fermentación alcohólica.

Los aminoácidos libres presentes en el vino pueden tener diferentes orígenes. Los que proceden de la uva pueden ser parcial o totalmente metabolizados por las levaduras durante la fermentación. Otros aminoácidos libres son liberados por las levaduras al final de la fermentación o liberados mediante procesos de proteólisis durante la autólisis de las levaduras. Los aminoácidos libres más abundantes en el vino son la prolina y la arginina. Estos dos aminoácidos tienen como precursor común al ácido glutámico, aminoácido que también se encuentra entre los más abundantes (Moreno-Arribas y col., 2000; Moreno-Arribas y col., 1998a).

La evolución de los aminoácidos libres durante la fermentación alcohólica ha sido objeto de importantes y numerosos estudios. Al comienzo de la fermentación las levaduras utilizan para su desarrollo el nitrógeno de las sales de amonio y, posteriormente, el de los aminoácidos libres. Algunos de estos son asimilados preferentemente. Se trata de la arginina, el ácido glutámico, la glutamina, el ácido aspártico, la asparagina, la treonina y la serina. Simultáneamente, por procesos enzimáticos, las levaduras degradan las proteínas a péptidos y a aminoácidos hasta que culmina la fermentación. La presencia de exoproteasas en las levaduras ha sido puesta de manifiesto por (Feuillat y col., 1980). La autólisis y la cesión de aminoácidos por las levaduras también pueden ser factores que contribuyan al aumento de la concentración de aminoácidos libres después de la fermentación.

Numerosos factores intervienen en el consumo de nitrógeno por las levaduras durante la fermentación alcohólica, entre ellos, la temperatura (López y col., 1996), la concentración de azúcares, cuanto más elevada mayor necesidad de nitrógeno (Agenbach, 1977), y la concentración de oxígeno (Ingledew y Kunkee, 1985). El suplemento del medio en nitrógeno

amoniacal en bajas concentraciones (por ejemplo, 0,23 mg/L de fosfato diamónico, valor próximo al máximo autorizado para el enriquecimiento en nitrógeno) tiene poca incidencia sobre la utilización de los aminoácidos (Monteiro y Bisson, 1992). Por el contrario, la adicción de dosis elevadas de esta sal (2,0 g/L) disminuye fuertemente el consumo y la degradación de arginina, así como la formación de poliaminas como la putrescina, la espermina y la espermidina.

En un estudio realizado por (Dizy y Polo, 1996) se observó que los aminoácidos mayoritarios en mosto de uva de la variedad Malvar fueron glutamina, arginina, prolina y el ácido γ -aminobutírico (Gaba). Los autores encuentran que, durante la fermentación, la concentración de prolina aumenta, mientras que la de arginina disminuye, debiéndose este proceso a que la prolina procede del metabolismo de la arginina, coincidiendo este hecho con que la glutamina es metabolizada fácilmente, lo que confirma los resultados obtenidos (Ough y col., 1991). Durante la primera etapa de la fermentación se consumen prácticamente la totalidad de los aminoácidos libres. En el tiempo transcurrido entre el final de la fermentación y el trasiego, se produce un incremento de los aminoácidos libres, lo cual lo relacionan con la autólisis de levaduras.

1.3.1.2. Evolución de los aminoácidos libres en el vino durante la fermentación maloláctica.

Durante la elaboración de los vinos tintos y, especialmente, después de que la fermentación alcohólica haya finalizado, se produce la fermentación maloláctica por acción de las bacterias lácticas, usualmente en el mismo depósito. El principal propósito de la fermentación maloláctica es reducir la acidez del vino, mediante la transformación del ácido málico (ácido dicarboxílico), en ácido láctico (ácido monocarboxílico).

La evolución de los aminoácidos libres de los vinos durante la FML ha sido ampliamente estudiada (Ribereau-Gayon y col., 1975; Davis y col., 1986). La concentración de algunos de ellos disminuye fuertemente (arginina, glicina, tirosina, fenilalanina, histidina, α -alanina y serina), mientras que la de otros aminoácidos puede aumentar significativamente (ácido aspártico, ácido glutámico, leucina, metionina, isoleucina y triptófano). Aunque existe poca información sobre la presencia de proteasas en las bacterias lácticas del vino, se pone de manifiesto una concentración de aminoácidos libres más elevada al final del crecimiento bacteriano en el vino que al principio.

Generalmente, *Oenococcus oeni* (nombrado anteriormente como *Leuconostoc oenos*) es el microorganismo responsable de la fermentación maloláctica durante la elaboración del vino y es la bacteria más frecuentemente utilizada para realizar ésta, debido a su disponibilidad para resistir diversas condiciones límites en el vino, especialmente la acidez (Tourdot-Marechal y col., 1999). Existen diferentes factores que influyen en el crecimiento bacteriano en el vino, algunos de ellos han sido muy estudiados (etanol, pH, temperatura y concentración de SO₂), mientras que sobre otros, como la escasez de nutrientes, existen menos estudios. (Alexandre y col., 2004) indican que el consumo y la liberación de nutrientes por las levaduras puede influir ampliamente en el desarrollo de la FML.

Durante la FML, también se produce la formación de compuestos volátiles, los cuales enriquecen la calidad aromática del vino (Henick-Kling, 1995; de Revel y col., 1999). Así mismo, algunos aromas surgidos durante la fermentación alcohólica por la acción de las levaduras desaparecen o se modifican durante este proceso (Moreno-Arribas y Polo, 2005). Esta segunda fermentación incrementa el pH y mejora el sabor y las cualidades sensoriales del vino. Además, la FML estabiliza el vino microbiológicamente.

1.3.1.3. Evolución de los aminoácidos libres en vinos espumosos y vinos envejecidos sobre lías.

La composición en aminoácidos libres tiene gran importancia en la producción de vinos espumosos, porque, además de actuar como fuente de nitrógeno para las levaduras durante la segunda fermentación, actúan como precursores de compuestos del aroma, lo que contribuye a las características particulares de estos vinos.

Son muchos los autores que han estudiado la evolución de la composición en aminoácidos libres durante la segunda fermentación (Usseglio-Tomasset y col., 1983; Lurton y col., 1989; Herraiz y col., 1993c; Ariízumi y col., 1994) y el envejecimiento de los vinos en botella (Suárez y col., 1979; Feuillat y Charpentier, 1982; Postel y Ziegler, 1991) y aunque existen discrepancias respecto a la variación de la concentración individual, los distintos autores coinciden en el hecho de que durante la segunda fermentación disminuye el contenido de la mayoría de aminoácidos y en que durante el envejecimiento en botella con las levaduras se produce un aumento de estos.

De la Presa-Owens y col. (1995) observaron que los aminoácidos libres mayoritarios presentes en los vinos base de diferentes variedades de uva estudiadas eran asparagina, glutamina, Gaba, ornitina, triptófano y prolina. Por otro lado, (Martínez-Rodríguez y col., 2002) han comprobado que los aminoácidos libres mayoritarios presentes en los vinos base estudiados son prolina, ácido glutámico, lisina y arginina, viéndose casi todos los aminoácidos libres afectados por la cepa de levadura utilizada en el tiraje y por el tiempo de envejecimiento. Los aminoácidos prolina, ácido aspártico, ácido glutámico y leucina sufren un descenso en su concentración durante los primeros días después de la inoculación de las levaduras en el vino base, presentando un aumento casi generalizado durante el envejecimiento.

En los últimos años se han realizado estudios sobre la composición de aminoácidos libres en vinos espumosos españoles. En un estudio realizado por (Moreno-Arribas y col., 1998a), los autores ponen de manifiesto que en tres de las cuatro variedades de uvas estudiadas, que dan lugar a vinos espumosos, los aminoácidos libres presentan un contenido menor después de nueve meses de envejecimiento con levaduras respecto de los vinos base. Durante el envejecimiento con levaduras se produce un aumento, del contenido en aminoácidos libres, en todos los vinos espumosos estudiados, detectándose la concentración máxima a diferentes tiempos de envejecimiento para cada vino. En los últimos meses de envejecimiento hay una disminución en la concentración de aminoácidos libres, lo cual se atribuye a reacciones de descarboxilación o desaminación o a la formación de ésteres. El aminoácido mayoritario en todos los casos fue la prolina, presentando una alta concentración los aminoácidos α -Alanina, Gaba, ácido glutámico y arginina. Por otra parte, sólo se observa una disminución de la glutamina en los vinos que han realizado la segunda fermentación y han envejecido nueve meses con levaduras, respecto de los vinos base, observándose pequeñas diferencias en los aminoácidos glutamina, β -alanina y triptófano entre los nueve y los treinta y un meses de envejecimiento con lías. Los resultados obtenidos revelan que la variación en la composición en aminoácidos libres de los vinos espumosos depende de la variedad de uva y de la composición del vino base. En este estudio, se observa que la distribución de aminoácidos libres es muy diferente de la distribución de aminoácidos en péptidos y proteínas.

Moreno-Arribas y col. (1996) estudiaron la evolución de diferentes fracciones nitrogenadas durante el envejecimiento de vinos espumosos. Entre el tercer y noveno mes de envejecimiento sobre lías, no se observaron diferencias en la concentración de aminoácidos libres. Después de los nueve meses de envejecimiento, ésta se incrementó, lo que indicaba el inicio de la autólisis. Sin embargo, Nunez y col. (2005) observaron que la autólisis comenzaba

entre los seis y los nueve meses de envejecimiento. Aunque se estima que la autólisis podría comenzar a los 6 meses de envejecimiento del vino en contacto con las lías de levaduras, este tiempo, según diversos autores, puede variar en función la temperatura, presión, tipo de cepa de levadura, variedad de uva, etc., como se ha comentado anteriormente.

En años recientes, en un intento de obtener vinos de una calidad más compleja desde una perspectiva organoléptica y que presenten su propia personalidad, se están introduciendo nuevas tecnologías de producción en las bodegas, incluyendo el envejecimiento en barricas en las que se añaden las lías de la fermentación alcohólica y de la fermentación maloláctica. Otro método de producción consiste en realizar la fermentación maloláctica en barricas de roble en las cuales el proceso de envejecimiento tiene lugar, y en donde, además, el vino es envejecido con sus propias lías. Durante el envejecimiento con lías, el vino es agitado regularmente, con mayor o menor frecuencia, para facilitar la transferencia de compuestos de las lías al vino. Sin embargo, esta tecnología es reciente y, prácticamente, no existen estudios enfocados al estudio de la composición nitrogenada en vinos tintos envejecidos sobre lías.

1.3.2. Aminas biógenas.

Las aminas biógenas son bases orgánicas dotadas de actividad biológica que provienen esencialmente de la descarboxilación de los aminoácidos. Están presentes en diversos alimentos y bebidas de forma natural, como consecuencia de un proceso normal de fermentación o de una alteración microbiana. En el vino se han descrito veinticinco aminas biógenas distintas (Vázquez-Lasa y col., 1998). Las principales aminas biógenas detectadas en los vinos se muestran en la figura 1.3-1 junto con sus aminoácidos precursores y son putrescina, cadaverina, agmatina, espermidina y espermina (alifáticas), tiramina y 2-feniletilamina (aromáticas) e histamina y triptamina (heterocíclicas). En el vino están presentes, además, aminas volátiles, con escasa actividad biológica aunque sí sensorial. Entre ellas, se han descrito: metilamina, dimetilamina, etilamina, etanolamina, n-propilamina, isopropilamina, pirrolidina, morfolina, isobutilamina, n-butilamina, n-amilamina, isoamilamina, hexilamina, 3-metiltiopropilamina.

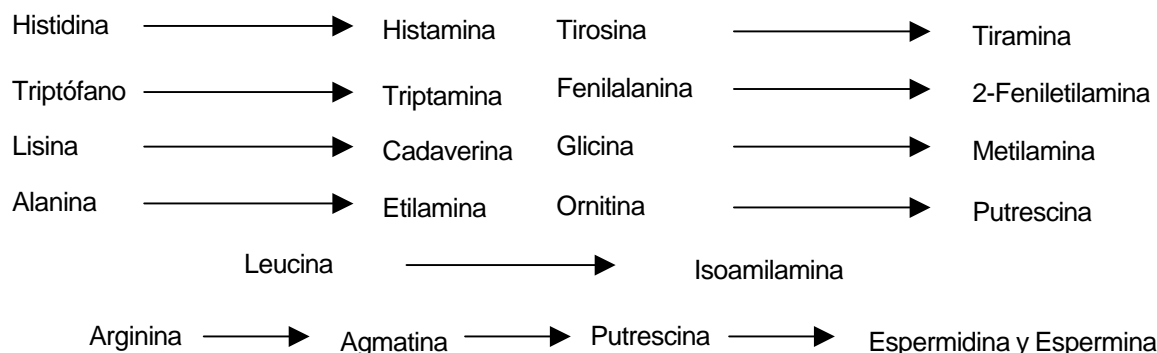


Figura 1.3-1. Algunos aminoácidos precursores de aminas biógenas y sus correspondientes aminas.

Durante la FML, existe el riesgo de que las bacterias ácido lácticas den lugar a aminas biógenas, principalmente mediante la metabolización de los aminoácidos, como ocurre en otros productos alimentarios fermentados. Las aminas biógenas, en determinadas concentraciones, producen efectos fisiológicos indeseables en el organismo humano, especialmente en individuos sensibles (Bauza y col., 1995), debiéndose evitar su presencia.

Algunas aminas, como por ejemplo, histamina, tiramina, putrescina, espermina y cadaverina son compuestos indispensables para los seres vivos, ya que ejercen una función importante en la síntesis de proteínas y en la estabilización de las membranas celulares (ten Brink y col., 1990; Silla, 1996). Intervienen en la regulación de la temperatura corporal, así como en el control del volumen estomacal y en su pH.

Sin embargo, estos compuestos ingeridos en altas cantidades en la dieta pueden dar lugar a diferentes alteraciones en el organismo, como se ha mencionado anteriormente. En el tracto intestinal existen enzimas que permiten la destoxificación de las aminas al metabolizarlas. Estas enzimas son las amino oxidasas: monoamino oxidasa (MAO) y diamino oxidasa (DAO). Además, la histamina, también, puede ser metabolizada por la histamina N-metiltransferasa (HMT) (Stratton y col., 1991).

La formación de aminas biógenas en vinos depende del tipo de bacterias ácido lácticas presentes con actividad enzimática descarboxilante de los aminoácidos precursores. El pH del vino y la cantidad de dióxido de azufre añadida al inicio de la vinificación también afecta a la

cantidad y a los tipos de bacterias ácido lácticas presentes en el vino (Martín-Álvarez y col., 2006; Vidal Carou y col., 1990; Lonvaud-Funel, 2001).

Las condiciones que favorecen la formación de las aminos biógenas en el vino, no están del todo claras. Algunos autores han relacionado la presencia de aminos con malas condiciones sanitarias de las uvas o durante el proceso de vinificación (Zee y col., 1983; Vidal-Carou y col., 1991; Leitão y col., 2005). Otros autores han descrito que las levaduras, durante la etapa de la fermentación alcohólica, pueden ser responsables de la formación de aminos biógenas (Lafon-Lafourcade, 1975). No obstante, existen evidencias de la relación que tiene la formación de estos compuestos con la etapa de fermentación maloláctica (Ough y col., 1987).

Las bacterias lácticas pueden exhibir dos tipos de metabolismo respecto a las hexosas: homofermentativo y heterofermentativo. El metabolismo homofermentativo se caracteriza porque las hexosas dan lugar, exclusivamente, a dos moles de ácido láctico por cada mol de hexosa metabolizada. El metabolismo heterofermentativo origina por cada mol de hexosa consumida, 1 mol de CO₂, 1 mol de etanol (o ácido acético) y 1 mol de ácido láctico. Las bacterias lácticas que sólo poseen esta vía para fermentar los azúcares se denominan heterofermentativas estrictas. Se sabe que las bacterias lácticas del vino pueden degradar la arginina por diferentes vías. Una de ellas sugiere que la degradación de la arginina es producida por medio de la arginasa, dando lugar a la formación de ornitina y urea (figura 1.3-2). (Kuensch y col., 1974). Otra vía es la catabolización de la arginina mediante la arginina desiminasa (ADI), como se describe para otras bacterias heterofermentativas (Liu y col., 1994; Manca de Nadra y col., 1986a; Manca de Nadra y col., 1986b). No existe evidencia experimental de la presencia de arginasa en las bacterias lácticas. Sin embargo, la ADI ha sido encontrada en bacterias lácticas de diferentes productos lácteos, carnes y frutas (Montel y Champomier, 1987; Arena y col., 1999a). Así, es muy probable que las bacterias lácticas del vino degraden la arginina por medio de la ADI. Esta vía comprende la actuación de tres enzimas: la arginina desiminasa (ADI) que transforma la arginina en citrulina y amoníaco; la ornitina carbamoil transferasa (OTC), que convierte la citrulina en ornitina y carbamoil fosfato, y la carbamato quinasa (CK) que transforma el carbamoil fosfato en CO₂, NH₃ y ATP (figura 1.3-2), (Arena y col., 1999b; Liu y col., 1995).

La arginina es un aminoácido esencial para *Oenococcus oeni*, bacteria responsable mayoritariamente de la FML y que muestra actividad, cepa-dependiente, de las tres enzimas responsables de la vía ADI, degradando la arginina como fuente de energía (Mangani y col.,

2005; Fourcassie y col., 1992). También se puede producir la descarboxilación de la arginina para dar agmatina por medio de la arginina descarboxilasa (ADC).

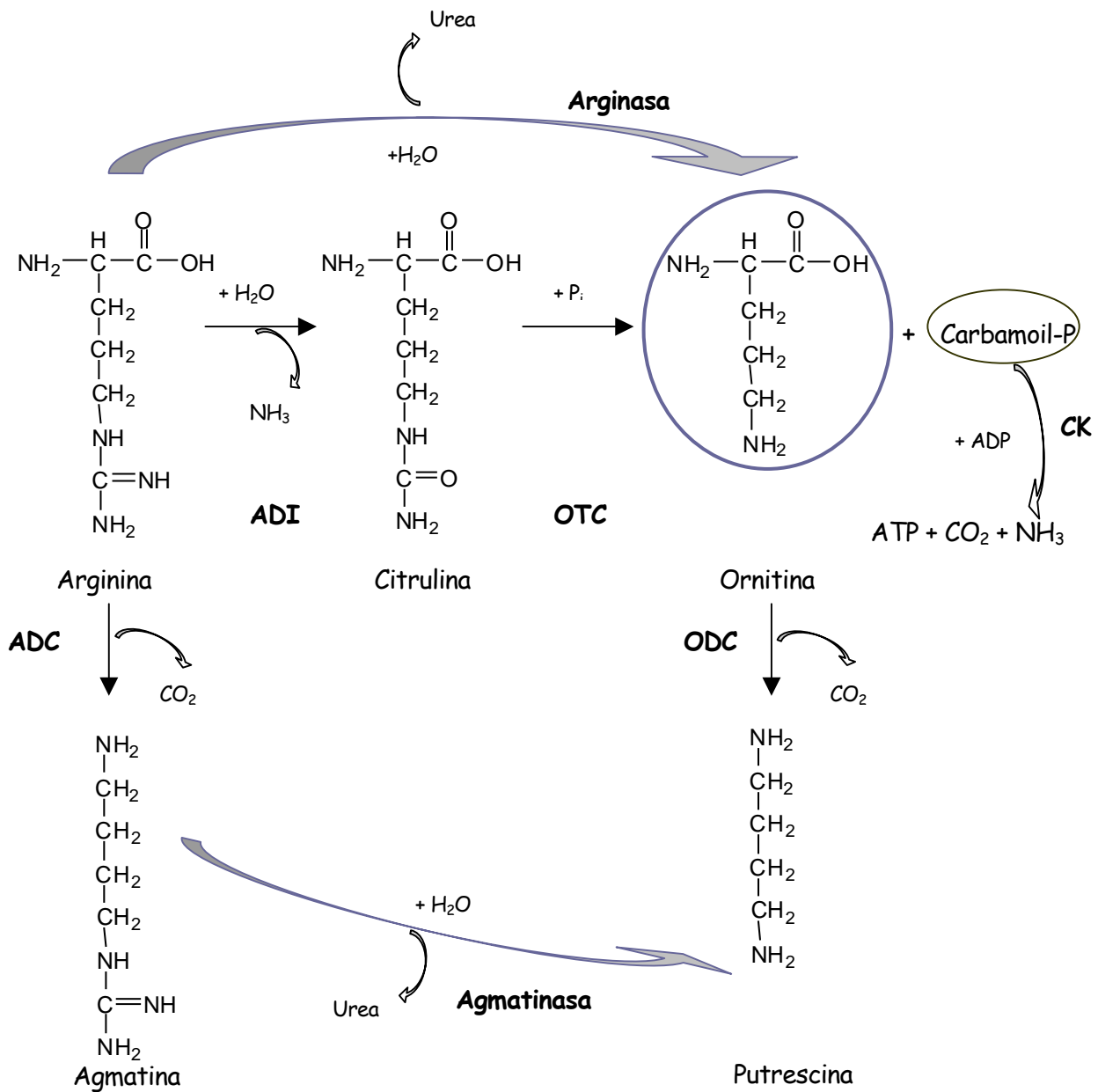


Figura 1.3-2. Catabolización de la arginina mediante la arginina desiminasa.

Tradicionalmente, en el vino, la formación de histamina se había relacionado con la presencia de bacterias alterantes del género *Pediococcus* (Delfín, 1989; Farias y col., 1993). Sin embargo, en 1994 se aisló una cepa de *Oenococcus oeni* capaz de producir histamina (Lonvaud-Funel y Joyeux, 1994). Con la enzima purificada se comprobó que sólo era capaz de descarboxilar histidina, lo que indicaba que esta enzima no era la responsable de la síntesis de otras aminas biógenas encontradas en el vino ya que era una enzima altamente específica (Rollan y col., 1995).

(Feuillat y col., 1977; Davis y col., 1988), deducen que las bacterias lácticas no pueden desarrollarse en presencia de proteínas del vino como única fuente de nitrógeno y no detectan actividad proteásica en las bacterias lácticas de los vinos estudiados. Sin embargo, posteriormente, se ha detectado la producción de proteasas extracelulares en cepas de *Oenococcus oeni* (Rollan y col., 1993) y se ha observado que las bacterias lácticas poseen diferentes actividades peptidásicas que aumentan en presencia de sustratos nitrogenados complejos tales como las manoproteínas originarias de las levaduras (Guilloux-Benatier y col., 1993). Estos resultados indican que las bacterias lácticas del vino, y concretamente *Oenococcus oeni*, podrían intervenir en la degradación de las proteínas o de los péptidos del vino. Esta suposición concuerda con los resultados obtenidos por (Manca de Nadra y col., 1999; Manca de Nadra y col., 1997).

Remize y col. (2006) determinaron los aminoácidos esenciales para el crecimiento de cinco cepas diferentes de *Oenococcus oeni*. Estos aminoácidos son ácido glutámico, metionina, fenilalanina, serina y tirosina para todas las cepas estudiadas. Por otro lado, encuentran que los aminoácidos valina, leucina, triptófano, isoleucina, histidina y arginina son esenciales o necesarios para las cepas estudiadas, siendo indiferentes los aminoácidos alanina, glicina y prolina. Estos autores analizan los aminoácidos que son consumidos por las cepas de bacterias, observando que tres aminoácidos son consumidos principalmente, la arginina, la histidina y la lisina, por lo cual concluyen que no existe ninguna relación entre la naturaleza del aminoácido (esencial, necesario o indiferente), con la cantidad de aminoácido consumido por la bacteria.

En un estudio reciente, (Fernández y Manca de Nadra, 2006) se estudian las modificaciones de los aminoácidos libres producidas por bacterias ácido lácticas. En éste, se determinan los aminoácidos principalmente consumidos por la bacteria *Pediococcus pentosaceus* 12p (ácido glutámico, arginina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, metionina, serina, tirosina, treonina, triptófano) y los que son liberados al final del proceso de crecimiento por

Oenococcus oeni (ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, glicina, isoleucina, leucina, lisina, serina, treonina y valina). Cuando estas dos cepas son cultivadas juntas, se observa un incremento en los aminoácidos ácido glutámico, alanina, asparagina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, serina, tirosina y valina, con respecto a la bacteria *Oenococcus oeni* pura. Estos resultados indican que la estimulación del sistema proteolítico por la mezcla de estas dos bacterias incrementa la liberación de aminoácidos esenciales.

1.3.3. Péptidos.

Los péptidos, junto con los aminoácidos libres, son los compuestos mayoritarios de la fracción nitrogenada del vino, como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, apenas hay estudios orientados a su caracterización dadas las dificultades de su análisis. Los primeros trabajos determinaban los péptidos en la fracción nitrogenada del vino después de haber eliminado las proteínas y estimaban su contenido como la diferencia de los aminoácidos totales de esta fracción y los aminoácidos libres contenidos en ella (Poux y Ournac, 1970; Yokotsuka y col., 1975; Usseglio-Tomasset y col., 1978; Margheri y col., 1984; Usseglio-Tomasset y Bosia, 1990). En estudios posteriores, se utilizaron técnicas cromatográficas para aislamiento y se determinó el contenido en aminoácidos bien de la fracción completa o de picos cromatográficos, más o menos puros, aislados.

1.3.3.1. Análisis, aislamiento y caracterización de los péptidos.

No existe ningún método específico para la cuantificación de los péptidos presentes en el vino debido a la interferencia de otros compuestos como los aminoácidos libres, proteínas y fenoles. Su concentración se puede calcular de forma aproximada por la diferencia entre el nitrógeno total y la concentración del nitrógeno de los aminoácidos libres más el nitrógeno de las proteínas.

La separación de los péptidos individuales se realiza habitualmente por HPLC, pero dada su complejidad es necesario realizar sucesivos pasos de fraccionamiento de la muestra y eliminar los compuestos que pueden interferir en su análisis como las proteínas, los aminoácidos libres y los compuestos fenólicos. Para separar los péptidos de las proteínas se pueden precipitar los compuestos de alto peso molecular con distintos agentes precipitantes: etanol, metanol, acetona, ácido tricloroacético, sulfosalicílico, fosfotungstico, pícrico, etc., seguida de centrifugación o

filtración. De estos métodos de eliminación de proteínas, solo se ha utilizado para el estudio de los péptidos del vino, la precipitación con etanol (Moreno-Arribas y col., 1998a).

La ultrafiltración permite la obtención de fracciones con distintos pesos moleculares dependiendo del tamaño de corte de las membranas. Esta técnica ha sido utilizada para el aislamiento de péptidos de mostos y vinos por (Usseglio-Tomasset y Di Stefano, 1978; Colagrande y Silva, 1981) y más recientemente por (Acedo y col., 1994; Dos Santos y col., 2000; Desportes y col., 2000).

Los métodos clásicos de cromatografía preparativa como cromatografía de exclusión molecular, cambio iónico, cromatografía de intercambio de ligandos, cromatografía de afinidad, etc., se han usado tradicionalmente para la separación de los péptidos, de compuestos de mayor peso molecular. Sin embargo para el estudio de los péptidos del vino, solo se ha utilizado la cromatografía de exclusión molecular en columnas de Sephadex. (Acedo y col., 1994; Desportes y col., 2000; Pozo-Bayón y col., 2007) han utilizado la cromatografía en Sephadex LH-20 como etapa previa al análisis de los péptidos del vino. El Sephadex G-10 se ha utilizado para la separación de los péptidos del vino (Moreno-Arribas y col., 1996) de masa molecular mayor y menor de 700 Da y para su separación de los aminoácidos libres. En algunos casos (Takayanagi y Yokotsuka, 1999) y como etapa previa al análisis por HPLC, se ha utilizado una columna abierta, de Cosmosil 140 C₁₈-OPN, de fase inversa, para la separación de fracciones peptídicas que permite, fundamentalmente, la separación en fase inversa.

La cromatografía de líquidos de alta eficacia es la técnica analítica más utilizada para la separación de fracciones peptídicas o de péptidos individuales. Habitualmente se utilizan columnas de fase inversa y como fases móviles agua con metanol o acetonitrilo como modificadores orgánicos. Debido a la elevada polaridad de los péptidos, es necesario utilizar un formador de pares de iones en la fase móvil para facilitar la interacción de los péptidos con la fase estacionaria. Normalmente, la elución requiere la utilización de gradientes de polaridad. Acedo y col. (1994); Moreno-Arribas y col. (1996) y Desportes y col. (2000) han utilizado esta técnica para separar los péptidos de vinos y (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000b) para separar los péptidos liberados por las levaduras en medios vínicos modelo.

Los péptidos se detectan en un sistema cromatográfico, normalmente, a unas longitudes de onda entre 200 y 220 nm, aunque los péptidos que contienen aminoácidos aromáticos en su estructura pueden ser detectados a 254 nm (fenilalanina, tirosina y triptófano) o a 280 nm (tirosina

y triptófano). Con el fin de evitar la interferencia de otros compuestos que también absorben a estas longitudes de onda se puede llevar a cabo una derivatización de los péptidos para poder ser detectados a longitudes de onda más altas y más específicas. También se puede aprovechar la fluorescencia natural de algunos aminoácidos (tirosina y triptófano) para detectar péptidos que contengan estos aminoácidos o bien formar derivados fluorescentes (Herraiz y col., 1994).

Aunque se puede utilizar la formación de derivados pre y postcolumna, la reacción postcolumna permite la detección de los péptidos con un detector de ultravioleta según eluyen de la columna y llevar a cabo, posteriormente, la derivatización en línea para formar derivados fluorescentes que son detectados por fluorescencia. La respuesta que se obtiene por fluorescencia después de la derivatización con ortoftaldialdehído (OPA) de los péptidos es, generalmente, menor que la obtenida con los aminoácidos (Chen y col., 1979).

La HPLC utilizando columnas analíticas o semipreparativas permite la recogida de picos cromatográficos para su purificación y posterior análisis, cuantificándose los aminoácidos que lo constituyen tras su hidrólisis o bien se puede conocer la secuencia aminoacídica tras su secuenciación.

La caracterización de los péptidos es el proceso más complicado de los que implica su análisis, debido al amplio rango de estructuras (composición en aminoácidos y su secuencia) que pueden presentar estos compuestos. Con la utilización de detectores de fotodiodos alineados (PDA), que permiten obtener rápida información del espectro en todo el rango de longitudes de onda, es posible confirmar la identidad de algunos de los péptidos. Estos sistemas han sido empleados por varios autores (Moreno-Arribas y col., 1998b; Bartolomé y col., 1997; Acedo y col., 1994; Perrin y col., 1995) para la identificación de péptidos separados por cromatografía de líquidos de alta eficacia que contenían tirosina, fenilalanina y triptófano. (Bartolomé y col., 1997) han desarrollado un método que utiliza el acoplamiento en línea de dos sistemas de detección (PDA y fluorescencia) y determinaron distintos parámetros espectrales (máximos de absorbancia, intervalos de convexidad y mínimos de la 2ª derivada del espectro) para la identificación de los péptidos del vino, en cuya composición se encuentran presentes aminoácidos aromáticos.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica muy interesante basada en la separación de moléculas ionizadas en función de la relación masa/carga. Esta técnica se utilizó inicialmente para la determinación off-line de proteínas y péptidos, siendo desarrolladas más tarde interfases que permiten su acoplamiento con cromatografía líquida, cromatografía de gases

y electroforesis capilar. Mediante esta técnica es posible obtener información sobre los aminoácidos que constituyen los péptidos. Aunque es una técnica muy poderosa, no ha sido muy empleada para el estudio de los péptidos del vino, encontrándose en la bibliografía muy pocos trabajos relacionados con este tema (de Person y col., 2004; Flamini y de Rosso, 2006).

1.3.3.2. Evolución de los péptidos en el vino durante la fermentación alcohólica.

Durante las primeras etapas de la fermentación alcohólica, los péptidos son asimilados por las levaduras junto con los aminoácidos libres. Al final de la fermentación, se produce una excreción de aminoácidos libres y de péptidos pequeños al vino, procedentes de las levaduras (Dizy y Polo, 1996).

De acuerdo con los trabajos de Acedo y col (1994), Moreno-Arribas y col (1998a y 1998b) y Deportes (2000) los aminoácidos mayoritarios que forman parte de los péptidos de los vinos son prolina, Asx (ácido aspártico+asparagina) y Glx, (ácido glutámico+glutamina), serina, alanina, glicina, lisina, treonina y Gaba.

1.3.3.3. Evolución de los péptidos en el vino durante la fermentación maloláctica.

La fermentación maloláctica se produce generalmente en medios pobres en nutrientes nitrogenados por lo que las bacterias ponen en marcha mecanismos de hidrólisis de los péptidos. Feuillat y Brillant 1980, encuentran que la fracción de péptidos de peso molecular menor de 1000 Da es la principal responsable del crecimiento de *Leuconostoc oenos* (actual *Oenococcus oeni*), así como de *Lactobacillus plantarum* y de *Pediococcus cerevisiae*, mientras que los aminoácidos libres solo son importantes para el crecimiento de *Leuconostoc oenos*. En un estudio realizado con proteínas de vinos blancos (Manca de Nadra y col., 1997) los autores confirman la actividad proteolítica de la cepa de *Leuconostoc oenos* utilizada, sobre las proteínas del vino por el estudio de los perfiles cromatográficos de la fracción peptídica después de la actuación de la proteasa, así como por el estudio de los aminoácidos libres y totales antes y después de la actuación del enzima. Resultados similares obtuvieron utilizando como sustrato del enzima las proteínas de vino tinto (Manca de Nadra y col., 1999), Es de destacar que la acción proteolítica de *Oenococcus oeni* es mucho mayor en el vino tinto, a pesar de la menor concentración de proteínas en éste que en vino blanco. En este estudio, los autores detectan, mediante análisis cromatográfico, un mayor número de péptidos después de la acción de las proteasas. Estos resultados indican que la diferencia de comportamiento de la bacteria ácido

láctica según el vino es debido a la diferente disponibilidad de nutrientes, presentando el nitrógeno asimilable una influencia muy fuerte sobre el crecimiento del microorganismo.

1.3.3.4. Evolución de los péptidos en los vinos espumosos y en los vinos envejecidos sobre lías.

Como en la fermentación alcohólica de los vinos tranquilos, en la segunda fermentación de los vinos espumosos los péptidos son asimilados por las levaduras junto con los aminoácidos libres y, al final de la fermentación, se produce una excreción de aminoácidos libres y de péptidos pequeños, procedentes de las levaduras. Después de los procesos de fermentación, se realiza un periodo de envejecimiento en donde el vino está en contacto con las lías de levaduras. Durante este tiempo tiene lugar la autólisis de las levaduras, y consiguientemente, la liberación de compuestos intracelulares al medio, lo cual modifica las características organolépticas de los vinos (Charpentier y col., 2005; Nunez y col., 2005). Debido al proceso de autólisis de las levaduras se liberan enzimas al medio, aumentando la actividad proteásica del vino. Estas proteasas, que permanecen activas en el vino, hidrolizan enlaces peptídicos y son responsables de la formación de péptidos pequeños y aminoácidos libres.

En el análisis de la fracción peptídica de vinos espumoso elaborados por el método tradicional, Moreno-Arribas y col. (1996) obtuvieron perfiles cromatográficos muy similares en los distintos vinos, a pesar de que habían sido elaborados con una variedad de uva distinta, lo que sugiere, según los autores, que la composición peptídica de estos vinos podía estar más relacionada con la levadura utilizada que con la composición inicial del mosto. Durante el envejecimiento en botella, hay un incremento en la concentración de péptidos que alcanza el máximo después de doce o quince meses de envejecimiento, volviendo a decrecer después. Estos estudios han demostrado que la concentración de proteínas y aminoácidos en vinos de cava no es estable porque las proteinasas y peptidasas son liberadas por las levaduras al medio y continúan su acción. En un estudio posterior (Moreno-Arribas y col., 1998a), comprobaron que los aminoácidos mayoritarios que forman parte de los péptidos, en el vino base, son lisina, ácido γ -aminobutírico, treonina, glicina, prolina, serina y ácido aspártico más asparagina (Asx). Estos cuatro últimos aminoácidos son, también, los mayoritarios de los péptidos de vinos tranquilos estudiados por otros autores (Usseglio-Tomasset y Bosia, 1990; Acedo y col., 1994). En el estudio citado anteriormente (Moreno-Arribas y col., 1998a) comprobaron que los péptidos de peso molecular menor de 700 Da tienen, después de nueve meses de envejecimiento, una distribución de aminoácidos similar a la de los vinos base, excepto

para el ácido glutámico más la glutamina (Glx) y α -alanina, que aumentan, y el ácido γ -aminobutírico y la fenilalanina que disminuyen. Las diferencias más importantes en los aminoácidos de los péptidos las encuentran en los vinos espumosos entre los nueve y los treinta y un meses de envejecimiento en botella, siendo los aminoácidos ácido aspártico más asparagina, α -alanina y ornitina los que más aumentan y ácido glutámico más la glutamina, serina, treonina, valina e isoleucina los que disminuyen. Por otro lado, en la fracción mayor de 700 Da, los aminoácidos encontrados en mayor proporción en los péptidos de los vinos base fueron serina, glicina, prolina, ácido γ -aminobutírico y treonina. Tanto en los péptidos con peso molecular por debajo de 700 Da, como para los de peso molecular por encima de 700 Da, la mayoría de aminoácidos que componen estos péptidos no presentan diferencias significativas con relación a la variedad de uva de la que proceden, siendo el tiempo de envejecimiento el parámetro que más influye en la composición de los péptidos.

Martínez-Rodríguez y col., 2002 en el estudio de los péptidos de vinos espumosos elaborados partiendo del mismo vino base, con distintas cepas de levaduras, comprueban que la cantidad relativa de péptidos está influenciada significativamente por la cepa de levaduras y por el tiempo de envejecimiento. Así mismo, en un estudio posterior realizado sobre la influencia que tiene el tiempo de envejecimiento y la adición de bentonita (un coadyuvante utilizado en la elaboración de vinos espumosos para facilitar la separación de las levaduras, como se ha visto anteriormente) sobre el contenido peptídico de vinos espumosos (Martínez-Rodríguez y Polo, 2003) observan que ambos factores producen diferencias significativas en el contenido peptídico, en todos los casos el contenido del nitrógeno peptídico es mayor en los vinos elaborados sin adición de bentonita en la solución de tiraje. Estos resultados indican que la bentonita puede adsorber péptidos presentes en el vino.

Hay algunos estudios sobre los cambios que ocurren en los vinos tranquilos durante el envejecimiento en barricas en presencia de lías. Muchas investigaciones en este área han sido enfocadas en los cambios que se producen en la composición fenólica (Hernández y col., 2006) y en la de polisacáridos (Escot y col., 2001) de los vinos, y han sido realizadas en vinos en los que se han añadido paredes de levaduras o autolisados de levaduras obtenidos de soluciones modelo (Guilloux-Benatier y Chassagne, 2003; Salmon y col., 2003) pero no han sido abundantes los estudios dirigidos al análisis de la influencia de este método de producción sobre los cambios en la composición peptídica del vino.

Se han llevado a cabo algunos estudios de péptidos durante el envejecimiento de vinos de crianza biológica. (Dos Santos y col., 2000), observaron que durante las primeras semanas de envejecimiento el consumo de péptidos es del 52,2%, disminuyendo este porcentaje de péptidos consumidos durante el segundo mes de envejecimiento. Finalmente, a las quince semanas de envejecimiento, se produjo un aumento en la concentración peptídica. Durante este periodo de envejecimiento no hubo, prácticamente, cambios en la composición de los aminoácidos mayoritarios que formaban parte de los péptidos, siendo estos los aminoácidos prolina, glicina, ácido aspártico más asparagina, ácido glutámico más glutamina, alanina, lisina, serina y treonina, de los cuales el aminoácido mayoritario fue la prolina.

En los últimos años, está comenzando a ser común el envejecimiento en barricas, de vinos tintos sobre lías (Fornairon-Bonnefond y col., 2002), aunque es todavía un proceso experimental y no se han encontrado estudios sobre péptidos en este tipo de vinos.

1.3.4. Proteínas.

Las proteínas están en el vino, normalmente, en bajas concentraciones contribuyendo poco a su valor nutritivo. Sin embargo, desde el punto de vista tecnológico tienen una gran importancia debido a que contribuyen a la calidad de la espuma en los vinos espumosos. Por otro lado, la inestabilidad de las proteínas en los vinos blancos es uno de los principales defectos de estos vinos, puesto que pueden precipitar dando lugar a sedimentos que reduce el valor comercial del mismo.

Las proteínas del vino se consideran como una mezcla de proteínas procedentes de la uva y proteínas procedentes de la autólisis de levaduras. El contenido en proteínas solubles de cada una de las partes de la uva es diferente (Ferreira y col., 2000). Las semillas de la uva son las más ricas en estas proteínas, seguidas por la pulpa, siendo la piel el componente de la uva más pobre en proteínas. Las proteínas presentes en los mostos y en los vinos, de forma mayoritaria, aunque son diferentes debido al proceso de vinificación, tienen masas moleculares similares, comprendidas entre 25 y 35 kDa (Pueyo y col., 1993), siendo el perfil proteínico típico de la variedad de uva, el cual se conserva después de la fermentación. La cantidad de proteínas presente en los mostos depende de factores como la variedad de uva, el pH, las características del suelo y las condiciones en las que se realiza el prensado.

Pueyo y col. (1993) estudian el contenido en proteínas en los mostos de diferentes variedades de uva (Xarel-lo, Parellada, Macabeo y Malvar) y en los vinos correspondientes. Los resultados obtenidos son un mayor contenido proteico en los mostos y en los vinos de las variedades Xarel-lo y Malvar. El contenido proteico de los vinos es menor en todos los casos, siendo, de media, un 29% del contenido de los mostos en las variedades Xarel-lo, Parellada y Macabeo, que han sido elaborados industrialmente, y un 78% del contenido proteico de los mostos de la variedad Malvar, que han sido elaborados en una planta piloto. Estos valores son similares a los obtenidos por (Hsu y Heatherbell, 1987).

Waters y col. (1991), estudiaron la estructura de las proteínas del vino y determinaron que las proteínas mayoritarias del mismo, tenían una masa molecular comprendida entre 24 y 32 kDa. Los aminoácidos mayoritarios presentes en estas proteínas son Asx, glicina, serina, treonina, alanina y Glx, considerando a Asx y Glx como la suma de ácido aspártico-asparagina y de ácido glutámico-glutamina, respectivamente. En otro estudio, Waters y col. (1992), corroboran estos resultados, al detectar como aminoácidos mayoritarios, de las proteínas del vino estudiado, además de los anteriormente citados, los aminoácidos fenilalanina y tirosina.

En investigaciones posteriores, Waters y col. (1995), aíslan diferentes fracciones de proteínas de un vino blanco y en todas ellas encuentran como aminoácidos mayoritarios Asx, Glx, glicina, alanina, serina y treonina, lo cual confirma los resultados obtenidos anteriormente, pero, además, observan que en algunas de las fracciones se encuentran en cantidades importantes los aminoácidos prolina y arginina. (Waters y col., 1996), consiguen secuenciar, parcialmente, algunas de las proteínas del vino. Comprueban que ciertas secuencias peptídicas como Gly-Pro-Leu-Gln-Leu y Ile-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-His-Val-Thr-Glu, para el vino estudiado, coinciden con secuencias peptídicas del tipo taumatinas (tabaco, tomate, arroz, trigo, etc.) y quitinasas (judía, maíz, remolacha, etc.). En estudios realizados posteriormente, llegan a determinar la secuencia de seis péptidos obtenidos por hidrólisis de las proteínas del vino estudiado (Waters y col., 1998).

Moreno-Arribas y col. (1996), han estudiado la evolución en la composición de aminoácidos de las proteínas en vinos espumosos. Los aminoácidos encontrados en mayor proporción en las proteínas del vino base, son α -alanina, ácido aspártico más asparagina (Asx), prolina, serina, lisina y glicina, lo que coincide con los resultados obtenidos por Waters y col. (1995). Después de 31 meses de envejecimiento con levaduras, las proteínas de los vinos muestran un mayor porcentaje de ácido glutámico más glutamina, histidina y α -alanina.

Por tanto, de los trabajos realizados hasta el momento sobre las proteínas del vino, se puede destacar que los aminoácidos mayoritarios que se han encontrado formando parte de las proteínas son Asx, glicina, serina, treonina, alanina, Glx, y prolina, encontrándose su masa molecular entre los 24 y 36 kDa. A pesar de estos estudios, no han sido muy abundantes los trabajos realizados sobre este tema y todavía se conoce muy poco sobre las secuencias de las proteínas del vino, lo cual plantea un reto para el futuro.

1.4. Propiedades de los péptidos.

Los péptidos se encuentran de forma natural en los alimentos. Aparecen debido a la degradación parcial, por hidrólisis enzimática, de las proteínas y cadenas polipeptídicas. En algunos casos, proceden de compuestos de origen no proteico, como ocurre con los dipéptidos carnosina y anserina en músculos de vertebrados o el tripéptido glutatión en diferentes alimentos (frutas, vegetales, pescados, carnes). También, en ocasiones se encuentran formando parte de alimentos como aditivos. La hidrólisis de las proteínas de los alimentos puede dar lugar a péptidos que mejoren las propiedades funcionales de los mismos, pudiendo posibilitar una mejora en la alimentación parenteral (hidrolizados de caseína) e incluso puede permitir la eliminación de algunas proteínas en caso de intolerancia hacia estas.

Los péptidos tienen una gran variedad de propiedades funcionales en los alimentos, por ejemplo, antioxidantes, surfactantes, antimicrobianas, antihipertensivas, etc. Algunos péptidos presentan sabor, de manera que pueden desarrollar sabores característicos en los alimentos, como el sabor dulce o el amargo (Polo y col., 2000).

1.4.1. Propiedades físico-químicas.

Los péptidos están formados por la unión de aminoácidos, unidos mediante un enlace peptídico. La gran cantidad de aminoácidos que existen, posibilitan que pueda haber una gran cantidad de péptidos diferentes. Según el número de unidades de aminoácidos por péptido, se denominan dipéptido, tripéptido, etc., hasta llegar a los oligopéptidos (aproximadamente 10 aminoácidos). Por convenio, el C-terminal es el aminoácido con el grupo carboxilo libre y se sitúa a la derecha de la molécula, cuando la representamos gráficamente, y el N-terminal es el aminoácido con el grupo amino libre y se sitúa a la izquierda.

El comportamiento ácido-base de los péptidos se determina mediante el grupo α -amino libre del residuo N-terminal, por el grupo α -carboxilo libre del residuo C-terminal y por los grupos ionizables de las cadenas laterales. Los valores que presentan los pK de los grupos ácidos y básicos de los péptidos, son más altos y más bajos, respectivamente, que los correspondientes pK de los grupos C-terminal y N-terminal cuando el aminoácido está libre (no formando parte de péptidos o proteínas) (Belitz y Grosch, 1986).

Los grupos C-terminal y N-terminal de los péptidos, presentan la misma reactividad que cualquier aminoácido. Pueden sufrir reacciones de alquilación, conversión a amidas, esterificación, conversión a cloruros de ácido, reducción, etc. Algunas reacciones del grupo N-terminal son interesantes desde el punto de vista analítico, puesto que permiten su detección y cuantificación. Los péptidos, además, tiene la posibilidad de dar lugar a otro tipo de reacciones que no pueden darse en aminoácidos, como la reacción de Biuret, utilizada para la cuantificación de péptidos.

Los péptidos resultantes de hidrólisis enzimática presentan un menor peso molecular, así como un número mayor de grupos ionizables respecto de la proteína de partida. Esto da como resultado que la solubilidad, la actividad superficial, la capacidad espumante y la propiedad emulsionante puedan ser diferentes a las de la proteína sin hidrolizar (Caessens y col., 1997). Algunos hidrolizados de proteínas pueden ser usados por su poder antioxidante. De hecho, un hidrolizado de huevo da lugar a una disminución en la oxidación cuando se añade a galletas que contienen manteca. El aumento en la estabilidad es proporcional a la cantidad de hidrolizado añadido (Fujimaki, 1981). Este autor, también encuentra dipéptidos que presentan un mayor poder de inhibición de la autooxidación del ácido linoleico que cuando son mezclados con los correspondientes aminoácidos. Péptidos de semilla de soja, con capacidad antioxidante, han mostrado tener efecto sinérgico con antioxidantes no peptídicos (Chan y Decaer, 1994; Chen y col., 1995 y 1996).

Shimizu y col. (1984), han estudiado las propiedades emulsionantes de péptidos procedentes de la hidrólisis péptica de α_{s1} -caseína, comprobando que la fracción de péptidos tiene una capacidad emulsificante similar a la de la α_{s1} -caseína. Se han preparado hidrolizados de proteínas hidrofóbicas del gluten para incrementar la solubilidad del mismo y diversificar sus propiedades funcionales (Casella y Whitaker, 1990; Legay y col., 1997).

1.4.2. Propiedades sensoriales.

Las propiedades sensoriales de los alimentos tienen una gran importancia desde el punto de vista comercial y los péptidos pueden conferir a los alimentos una amplia gama de sabores, desde el amargo hasta los sabores más dulces. Péptidos amargos han sido identificados en hidrolizados de caseína (Visser y col., 1975), queso (Gómez y col., 1997) y semilla de soja (Fujimaki y col., 1970). Este sabor ha sido relacionado con la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y con la longitud de la cadena (Cliffe y Law, 1990; Ishibashi y col., 1987a, 1987b, 1988a y 1988b). Otagiri y col. (1985), determinaron que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en el C-terminal y de aminoácidos básicos en N-terminal provocaban un incremento en el amargor de di- y tri- péptidos. Además, la presencia de arginina unida a prolina produce un sabor amargo muy intenso.

Algunos péptidos enmascaran los sabores amargos de algunos alimentos. Ohya S. y col. (1988), encuentran que los péptidos que neutralizan el sabor amargo están constituidos por Ácido aspártico o Ácido glutámico y presentan un sabor similar al glutamato monosódico. Estos autores le dan a este sabor el nombre de "sabor umami". Otros péptidos presentan sabor dulce, como el aspartamo (éster metílico L-aspartil-L-fenilalanina). Tsang y col. (1984), determinan que los análogos al extremo de la serie del éster metílico del ácido L-aspartil- α -aminocicloalcano carboxílico tienen sabor dulce, los dipéptidos que contiene éster metílico del ácido α -aminociclohexano carboxílico y el éster metílico del ácido α -aminocicloheptano carboxílico presentan sabor amargo y los análogos a la serie del éster metílico del ácido α -aminociclooctano carboxílico son insípidos. Rodríguez y col. (1985), también encuentran que los sabores de series de tripéptidos con L-aspartil-D-alanil- α -aminocicloalcano, van desde los dulces a los amargos, e incluso algunos pueden ser insípidos, cuando el tamaño del anillo del aminoácido C-terminal se incrementa.

1.4.3. Propiedades funcionales.

Un alimento se considera funcional si puede ser demostrado que afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo, de modo que es relevante para la mejora del estado de salud y bienestar y/o disminuye el riesgo de padecer alguna enfermedad. Las propiedades funcionales de algunas proteínas se ven mejoradas, en algunas ocasiones, en los hidrolizados enzimáticos de estas pudiendo utilizarse como aditivos para aumentar la calidad de un alimento.

Las sustancias bioactivas de origen alimentario se definen como componentes (originales, derivados y aditivos) del alimento consumido que pueden dar lugar a una actividad regulada en el organismo humano más allá de su función alimentaria básica. Una gran diversidad de sustancias bioactivas derivadas de alimentos que no presentan carácter nutricional pueden considerarse como el origen para mantener una buena salud (Diplock y col., 2000). Debido a esto, en los últimos años, los investigadores están comenzando a considerar diferentes sustancias bioactivas de origen alimentario como ingredientes saludables, para su uso como alimentos funcionales con acciones específicas y que pueden ser consumidos como parte de la dieta diaria (Meisel, 2001).

Los péptidos bioactivos están entre los compuestos funcionales identificados en los alimentos en los últimos años. Se producen en la hidrólisis enzimática de alimentos como leche, carne, pescado, maíz, trigo, soja y huevo y también en productos fermentados (Yamamoto y col., 2003; Hernández-Ledesma y col., 2004; Gómez-Ruiz y col., 2004a).

1.4.3.1. Actividad antimicrobiana.

En los últimos años se ha comprobado que en la estructura primaria de las proteínas de alimentos se encuentran secuencias de péptidos que pueden ejercer actividad antimicrobiana, convirtiendo a las proteínas de los alimentos en un sustrato potencial para aumentar la defensa natural del organismo contra microorganismos invasores. Algunos de los alimentos en los que hay descritas secuencias peptídicas activas son el huevo (Ibrahim y col., 2002), las espinacas (Segura y col., 1998) y, sobre todo, la leche (Bellamy y col., 1992; Pellegrini y col., 1999; Recio y Visser, 1999).

1.4.3.2. Actividad antioxidante.

Los antioxidantes no sólo son importantes en la prevención de la oxidación en los alimentos, sino también a nivel fisiológico. Los radicales libres son unas moléculas que están en continua formación en las células del organismo. En situación normal la producción de radicales libres es constante y son neutralizados por las defensas antioxidantes. Existen factores que producen un desequilibrio en el número de radicales libres, y un exceso de estos puede dar lugar a un envejecimiento celular o al desarrollo de enfermedades (Bray, 2000). Todo esto ha llevado a la búsqueda de compuestos antioxidantes naturales para la prevención de la oxidación por parte de los radicales libres. El estudio de péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un

reto en los últimos años, habiéndose identificado numerosos péptidos que presentan actividad antioxidante en diferentes alimentos (Gibbs y col., 2004; Dávalos y col., 2004), y en derivados de ellos, como hidrolizados de gelatina (Kim y col., 2001), hidrolizados de clara de huevo (Fujimaki, 1981) y productos lácteos (Gobetti y col., 2002), entre otros.

Las propiedades antioxidantes en el vino han sido, principalmente, atribuidas a los polifenoles (Cooper y col., 2004), sin embargo, en algunos estudios se ha encontrado que péptidos derivados de levaduras, liberados de su autólisis (Moskovitz y col., 1997; Lee y col., 2006), pueden presentar actividad antioxidante. Se ha descrito que los aminoácidos libres también pueden presentar actividad antioxidante (Meucci y Mele, 1997; Park y col., 2005). De este modo, la fracción peptídica debe ser aislada para conocer la implicación real de ésta en la actividad antioxidante.

Uno de los métodos más utilizados para la determinación de la actividad antioxidante es un método basado en la reacción de la fluoresceína (FL) con el radical peróxido formado a partir del compuesto 2,2'-Azobis(2-metilpropionamida) (AAPH) en presencia y ausencia de un antioxidante. En este ensayo se cuantifica la capacidad, en concentración, de la muestra para competir con la FL para atrapar radicales de oxígeno, generados a partir del AAPH. Este compuesto sufre descomposición térmica, desprendiendo nitrógeno y generando un radical centrado en carbono, que en condiciones aeróbicas reacciona rápidamente con el oxígeno atmosférico dando un radical peróxido. Este radical reacciona con la FL dando lugar, principalmente, a dos compuestos, uno de ellos fluorescente (Ou y col., 2001), (figura 1.4-1). La fluoresceína tiene una longitud de onda de emisión de 520 nm y 485 nm de excitación, por lo que la reacción se puede seguir mediante la caída de emisión de fluorescencia a esta longitud de onda en función del tiempo. Cuando la reacción se realiza en presencia de un agente antioxidante, se produce una caída más suave de la fluorescencia, al competir éste con la FL por el radical peróxido. Esta caída de la fluorescencia es la que se utiliza para determinar la capacidad antioxidante de la muestra.

1.4.3.3. Actividad antihipertensiva.

La hipertensión es la principal causa de enfermedad en los países industrializados. El 35% de la mortalidad en estos países se debe a esta enfermedad o a alguna de sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales. Debido a esto, los alimentos que presentan péptidos con actividad antihipertensiva son de gran interés.

La angiotensina II es el compuesto vasoconstrictor más potente. Su acción da lugar a una rápida contracción de las arteriolas, y por tanto un aumento de la presión arterial. Además, estimula la secreción de aldosterona por parte de las glándulas suprarrenales. La aldosterona es una hormona que induce la acumulación de sodio y la excreción de potasio. El incremento en la concentración de sodio provoca una retención de agua y un consecuente incremento del volumen extracelular, lo que conlleva un aumento de la presión arterial y a la neutralización de la producción de renina. La renina libera el decapeptido angiotensina I del sistema renina-angiotensina. Este sistema es, quizás, el más importante de los diferentes mecanismos vasoconstrictores y vasodilatadores implicados en la regulación de la presión sanguínea (Ondetti y Cushman, 1982).

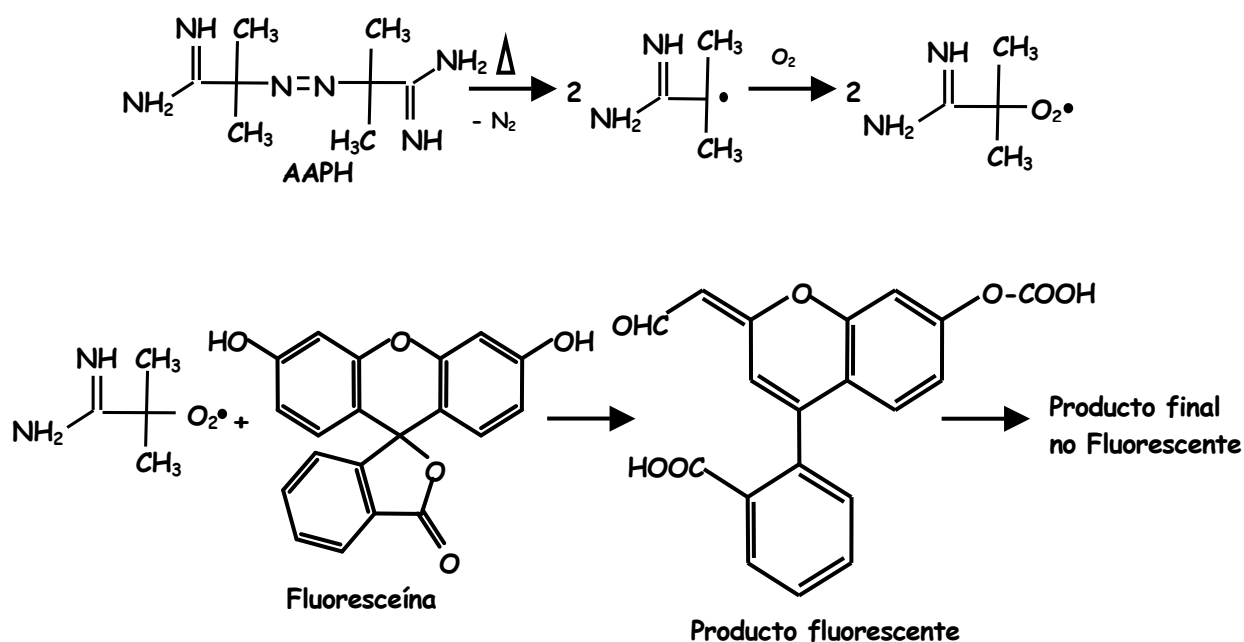


Figura 1.4-1. Proceso de oxidación de la fluoresceína en presencia de radical AAPH (Ou y col., 2001).

La Enzima convertidora de angiotensina (ECA) juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea ya que actúa mediante dos sistemas. Por un lado, en el sistema renina-angiotensina, ya que cataliza a la angiotensina I en el extremo C-terminal, para generar la angiotensina II, y por otro, en el sistema quinina-caliceína donde cataliza la

degradación de las bradiquininas. La ECA, implicada en el proceso, fue descubierta por Skeggs a mediados de 1950 (Skeggs y col., 1954), al comprobar que el plasma de caballo contenía una enzima que convertía la angiotensina I (DRVYIHPFHL) en angiotensina II (DRVYIHPF). La acción conjunta de la ECA en ambos sistemas induce el incremento de la presión arterial. La constitución de este sistema se muestra de manera esquemática en la figura 1.4-2, así como su interrelación con el sistema calicreína-quinina (Ondetti y Cushman, 1982).

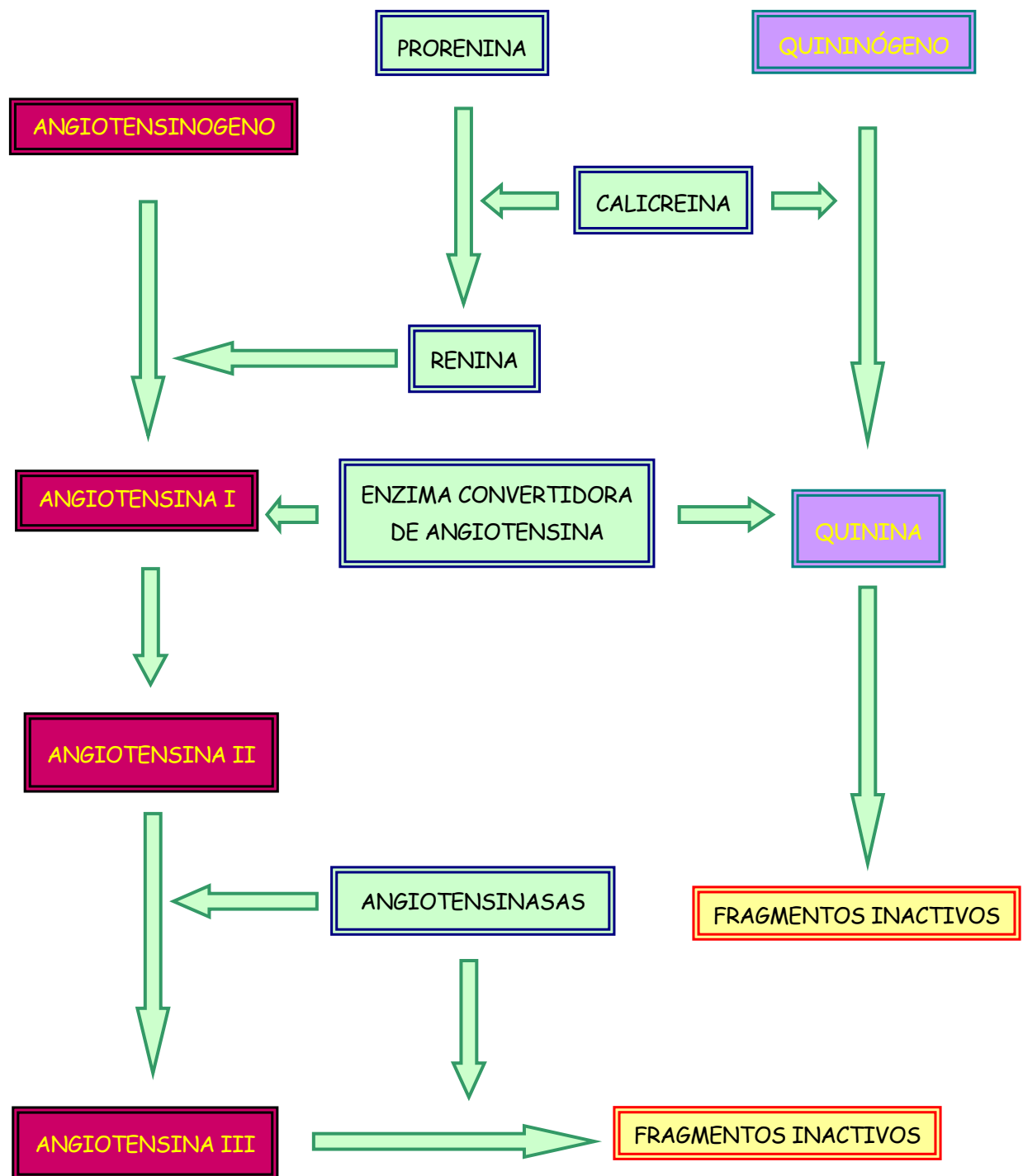


Figura 1.4-2. Sistemas renina-angiotensina y calicreína-quinina (Ondetti M.A. y Cushman D.W., 1982).

La principal función de la ECA es catalizar la hidrólisis del enlace peptídico Phe₈-His₉ del decapeptido inactivo angiotensina I, liberando el dipéptido His-Leu y generando el potente octapéptido vasoconstrictor angiotensina II, que como se ha mencionado anteriormente, también retiene sales. Este compuesto es el vasoconstrictor más poderoso (Bünning y col., 1978). La ECA también puede catalizar la liberación de dos dipéptidos sucesivos, el dipéptido Phe-Arg y el adyacente Ser-Pro del extremo C-terminal de la bradiquinina, de manera que inactiva a ésta. La bradiquinina es un nonapéptido, con propiedades natriuréticas (favorece la eliminación de sodio y de agua, y la absorción de potasio) y por tanto, presenta acción hipotensora.

Aunque se conoce que la actividad de conversión está presente en muchos órganos, se piensa que los niveles de angiotensina II presentes en la circulación sistémica están regulados por la hidrólisis de la angiotensina I en los pulmones, lo cual sugiere que la enzima responsable puede ser un constituyente de los capilares de la membrana endotelial. Los péptidos que potencian la acción de la bradiquinina también inactivan la ECA, lo que indica que la misma enzima de la membrana pulmonar puede participar en el mantenimiento de la presión del sistema sanguíneo por los dos mecanismos descritos anteriormente (Das y Soffer, 1975).

La ECA es una glicoproteína, con un peso molecular aproximado de 129000 Da, y formada por una cadena polipeptídica simple, con treonina y Alanina como residuos amino terminal y carboxilo terminal, respectivamente. Es una metaloproteína, presentando un átomo de Zn por molécula en el centro activo y un residuo de Lisina, que son esenciales para la actividad y está constituida por arginina y tirosina, principalmente (Bünning y col., 1978).

Esta enzima es una dipeptidil carboxipeptidasa con actividad sobre un amplio rango de sustratos oligopeptídicos, se activa en presencia de iones cloruro, e *in vitro* presenta una estrecha especificidad de sustrato. Se encuentra en múltiples tejidos, incluyendo pulmones, riñones, suero sanguíneo, cerebro y testículos (Caldwell y col., 1976). Se expresa fundamentalmente como ectoenzima unida a la membrana en células endoteliales de los vasos sanguíneos y en otro tipo de células como las epiteliales absortivas, las neuroepiteliales y las células germinales masculinas (Eldorrry y col., 1982).

La ECA hidroliza rápidamente sustratos pequeños, como los tripéptidos N-protectidos, teniendo una mayor actividad sobre aquellos que posean un aminoácido aromático en la antepenúltima posición. Su actividad es muy baja o incluso nula si el extremo C-terminal está

bloqueado, si tiene grupos amino libres, si presenta aminoácidos dicarboxílicos o si el penúltimo aminoácido es prolina.

Utilizando como sustrato modelo de la ECA el N-benzoil-Gly-His-Leu, se ha comprobado que se alcanza un mayor grado de hidrólisis al sustituir unos aminoácidos por otros. En general, si cualquiera de los tres aminoácidos se sustituye por alanina o fenilalanina, el grado de ruptura del sustrato se incrementa. Efecto contrario se produce si estos se sustituyen por Ácido glutámico o prolina. Aquellos compuestos que inhiban la actividad de la ECA podrán tener acción antihipertensiva, y muchos de ellos, ya se emplean con esta finalidad (Ondetti y Cushman, 1982). Se ha comprobado que el aminoácido N-terminal de dipéptidos también influye en la actividad inhibitoria, así la presencia de valina o de isoleucina en esa posición mostraron ser los más efectivos en la acción inhibidora de la ECA. La prolina es un aminoácido que disminuye la actividad inhibitoria cuando se encuentra en la posición N-terminal (Cheung y col., 1980).

Algunos trabajos se han centrado en la producción y aislamiento de péptidos inhibidores de la ECA, procedentes de proteínas de diferentes alimentos (Hernández-Ledesma y col., 2005; Miguel y col., 2005; Gouda y col., 2006). Algunos autores han encontrado en productos fermentados que péptidos con actividad inhibitoria de la ECA podrían, también, presentar actividad antioxidante, sugiriendo la presencia de actividad multifuncional en estos compuestos (Silva y col., 2006; Hernández-Ledesma y col., 2005). Se han identificado varios péptidos endógenos que actúan como inhibidores y sustratos competitivos de la ECA, como la Met- y Leu-encefalina, la β -endorfina, la β -lipotropina o las bradiquininas (Maruyama y col., 1987). Se han buscado inhibidores competitivos exógenos de esta enzima, a partir de distintas fuentes (pescado, maíz, gelatina, veneno de serpiente, vino, etc.). El origen de estas fuentes proteicas engloba tanto al reino vegetal como al reino animal. Los inhibidores competitivos compiten con el sustrato por el centro activo de la enzima. En este caso, el aumento en la concentración del sustrato da lugar a una disminución de la capacidad del inhibidor para competir con éste. Por otra parte, los inhibidores no competitivos se unen a la enzima en una zona diferente al centro activo, deformándolo, de manera que impide el enlace con el sustrato, siendo este tipo de inhibición independiente de la concentración de sustrato. Dependiendo de tipo de inhibidor se puede producir inhibición competitiva o no competitiva (Hernández-Ledesma y col., 2003).

La correlación entre la estructura y la actividad de los diferentes péptidos inhibidores de la ECA indica que el enlace de estos con la enzima está fuertemente afectado por la secuencia tripeptídica C-terminal del sustrato. Parece que la ECA se une con mayor fortaleza a sustratos o

inhibidores competitivos que contengan aminoácidos hidrofóbicos en cada una de las tres últimas posiciones, respecto al C-terminal (Fitzgerald y Meisel, 2000).

Los primeros péptidos inhibidores que se han identificado están presentes de manera natural en el veneno de determinadas serpientes. Consisten en secuencias de entre 5 y 13 aminoácidos. Entre ellos, el péptido de secuencia pirrolidinacarboxil-Lys-Trp-Ala-Pro, es el que muestra una mayor actividad inhibitoria competitiva de la ECA (Ondetti y col., 1971). En los últimos años se han descrito muchos péptidos que pueden actuar como antihipertensivos en el organismo.

Los aminoácidos mercaptoalcanoilos (figura 1.4-3), se propone que pueden enlazarse con el centro activo de la ECA de una manera similar a como lo hacen los residuos dipeptídicos terminales de un sustrato típico peptídico, pero con una fuerte interacción adicional, debido al grupo sulfhidrilo, con el ión Zn de la enzima. El inhibidor más potente de este tipo es el captopril (N-[(S)-3-mercapto-2-metilpropionil]-L-prolina), que es un compuesto de síntesis (figura 1.4-4). Actualmente es el fármaco más empleado como antihipertensivo, su estructura se basa en la de los péptidos identificados en el veneno de serpiente y es análogo a la secuencia dipeptídica Ala-Pro (Cheung y col., 1980). En la tabla 1.4-1 se recoge una relación de algunos péptidos inhibidores de la ECA, que han sido identificados y caracterizados, así como su procedencia.

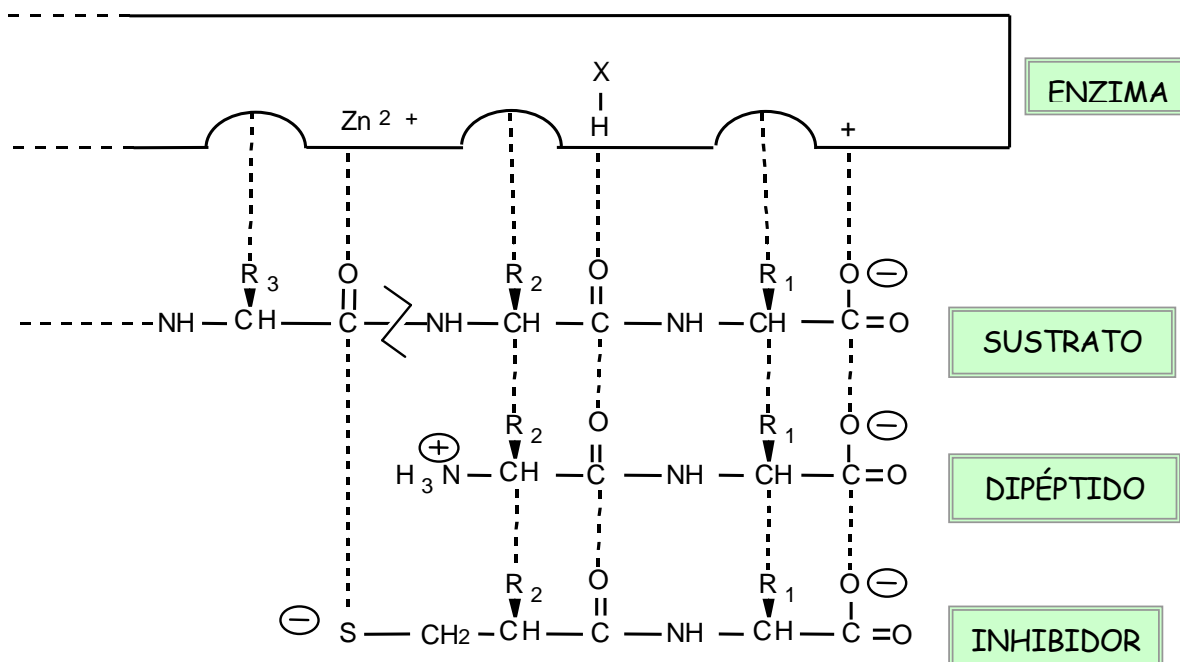


Figura 1.4-3. Formas de unión propuestas para el sustrato, dipéptido y aminoácido inhibidor mercaptoalcanoilo al centro activo de la ECA (Cheung y col., 1980).

Cheung y col. (1980), han determinado actividad inhibitoria de la ECA *in vitro*, en dipéptidos con diferentes secuencias de aminoácidos. Han encontrado que los péptidos que presentan una mayor actividad inhibitoria competitiva son los que tienen como aminoácidos C-terminal a triptófano, tirosina, prolina y fenilalanina y aquellos que presentan como grupo N-terminal a valina, isoleucina y arginina, por orden de actividad.

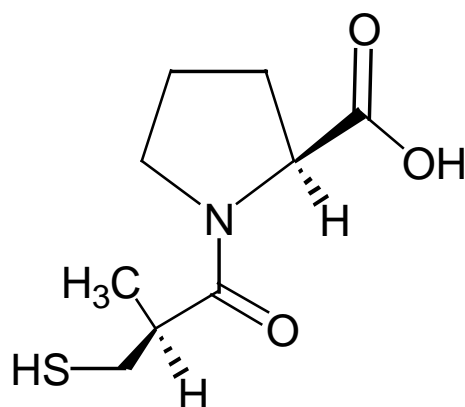


Figura 1.4-4. Fórmula estructural del Captopril.

Tabla 1.4-1. Relación de algunos péptidos, procedentes de diferentes alimentos, que pueden actuar como inhibidores de la ECA en el organismo y que han sido descritos en los últimos años.		
Fuente Proteica	Secuencia Peptídica	Referencia
Maíz	VHLPP; LPP; VHIPP; VHLA	Maruyama y col., 1989
Lías de Sake	VW; VWY; IYPRY; PRY; IY	Saito y col., 1994b
Sake	YGGY; GGY; VY	Saito y col., 1994b
Músculo de Sardina	LY; IY; KW; GRP; AKK; GWAP	Matsufuji y col., 1994
Gelatina Bovina	GPV; GPL	Kim y col., 2001
Espinacas	IAYKPAG; MRWRD; MRW; LRIPVA	YanJun y col., 2003
Cerdo	RMLGQTPTK	Katayama y col., 2004
Vino	LIPPGVPY; YYAPF; WVPSVY; AWPf	Takayanagi y Yokotsuka K., 1999
Queso manchego	VRGPFP	Gómez-Ruiz y col., 2002
	VRYL; KKYNVPL	Gómez-Ruiz y col., 2004b
	KHPIKHQ; ERYL; YPFTGPIPN	Gómez-Ruiz y col., 2004a
Clara de Huevo	RADHPFL; FRADHPFL; YAEERYPIL; IVF	Miguel y col., 2004
Productos lácteos fermentados	VPP; IPP	Nakamura y col., 1995
	LLF; LVRT; LQKW	Hernández-Ledesma y col., 2002
	PYVRYL; LVYPFTGPIPN	Quirós y col., 2005

Las estrategias que se han seguido para la identificación de los péptidos inhibidores de la ECA conllevan, generalmente, tres etapas:

- I. Aislamiento de los péptidos liberados tras la digestión enzimática *in vitro* o durante la elaboración del alimento como consecuencia de los procesos de fermentación. En estos procesos, los microorganismos responsables poseen un sistema proteolítico capaz de generar péptidos bioactivos a partir de las proteínas presentes en el alimento.
- II. Caracterización de los péptidos mediante sus espectros de masas y el empleo de bases de datos de espectros de masas de péptidos conocidos. Esta estrategia es útil para péptidos cortos de varios aminoácidos, que son iguales en distintas proteínas ó para péptidos procedentes de proteínas secuenciadas, de las que se conoce su composición en aminoácidos.
- III. Síntesis química de los péptidos o de sus fragmentos, con la misma estructura que los inhibidores identificados previamente y evaluación del índice IC₅₀ (concentración a la que el inhibidor bloquea el 50% de la actividad de la enzima)

Takayanagi y Yokotsuka (1999) han detectado actividad inhibitoria de la ECA en vinos blancos y tintos. Estos autores, han determinado la actividad inhibitoria de ECA de dos vinos tintos y cuatro vinos blancos en la pulpa, hollejo y semillas de uvas de la variedad tinta Muscat Bailey A y durante la fermentación del mosto para la obtención de vino. Comprueban que los vinos tintos tienen mayor actividad inhibitoria de la ECA que los blancos, y que es mayor en la pulpa que en el hollejo y las semillas. También observan que la actividad inhibitoria de la ECA disminuye durante la fermentación sin estar claras las causas de dicha disminución. Estos autores consiguen aislar seis péptidos diferentes con actividad inhibitoria de la ECA de este tipo de vino, mostrando dos de ellos un mayor poder de inhibición. Estos péptidos presentan los aminoácidos tirosina y fenilalanina, respectivamente, en el C-terminal. Este trabajo, junto con otro realizado por nuestro grupo (Pozo-Bayón y col., 2007) son los únicos existentes en la bibliografía sobre la actividad inhibitoria de la ECA de los péptidos del vino.

En la identificación de péptidos con actividad biológica en alimentos se presentan una serie de dificultades debidas a la complejidad de la matriz y a las bajas concentraciones en la que se encuentran los analitos, por lo que se hace necesario realizar etapas de purificación y

concentración de los péptidos de interés. Los péptidos con actividad IECA descritos hasta el momento son de pequeño tamaño.

Las técnicas de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) y de HPLC se han utilizado para la separación de los péptidos. Con posterioridad, la identificación se ha llevado a cabo mediante el análisis secuencial del extremo N-terminal (Ashar y col., 2004; Pan y Luo, 2005), por medio de espectrometría de masas combinada con el análisis secuencial del extremo N-terminal (Minervini y col., 2003; Didelot y col., 2006) o a través de espectrometría de masas (Gobbetti y col., 2004). El desarrollo de la técnica de HPLC acoplada a espectrometría de masas en tandem ha hecho posible el análisis de péptidos en mezclas complejas sin necesidad de realizar la separación previa de los componentes (Papayannopoulos, 1995). Estas técnicas analíticas son muy útiles para la identificación de péptidos bioactivos en matrices complejas como son los productos fermentados. Hasta el momento no han sido numerosos los estudios realizados con HPLC-MS-MS para la identificación de péptidos con actividad IECA.

1.5. Cromatografía de líquidos de alta temperatura.

El estudio de fuentes químicas naturales y sintéticas es un punto de partida para detectar compuestos activos. Hoy en día, el estudio de muestras complejas es muy demandado, presentando una fuerte relación entre análisis químicos, fraccionamiento de la muestra y ensayo biológico. En muchos casos, los constituyentes no activos de la muestra están en mayor proporción que los componentes con actividad farmacológica, y la identificación de estos requiere un fraccionamiento de la muestra previo a su análisis cromatográfico.

En los últimos años, técnicas como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) han sido empleadas para la separación de mezclas de compuestos, previamente a la realización de los ensayos biológicos. Estos ensayos son realizados en sistemas de flujo continuo, en donde el bioensayo se acopla al sistema, y son compatibles con diferentes técnicas de separación. En sistemas más avanzados, se utiliza la espectrometría de masas para la detección de los compuestos biológicamente activos, con lo cual no se necesitan, por ejemplo, marcadores fluorescentes como sería en el caso de utilizar detectores de fluorescencia. Por otro lado, en la actualidad está creciendo el interés en la HPLC utilizando altas temperaturas (HTLC), puesto que

esta última presenta una serie de ventajas sobre la primera. Entre otras, se encuentra la utilización de menores porcentajes de disolvente orgánico y permiten análisis más rápidos.

1.5.1. Antecedentes.

La cromatografía es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene la fase estacionaria. La cromatografía líquida de alta temperatura (HTLC) es una técnica cromatográfica similar a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), diferenciándose de ésta, principalmente, en que la elución se realiza a temperaturas superiores a 80 °C, lo que hace necesario modificar los equipos para poder operar en esas condiciones.

Los inicios de esta técnica están fechados en la década de 1970, debido al creciente interés de la HPLC y al detectar que la temperatura tiene una gran influencia en las separaciones cromatográficas (Kraak y Huber, 1974; Tsuji y Goetz, 1978). Uno de los aspectos más importantes a resolver ha sido obtener rellenos para las columnas, suficientemente estables a las altas temperaturas que se utilizan en HTLC. Estos rellenos comenzaron a desarrollarse con posterioridad (Warren y Bidlingmeyer, 1988), surgiendo, años más tarde, la necesidad de utilizar fases móviles que contuvieran menor cantidad de disolvente orgánico, por lo que pasa a tener una gran importancia el agua como fase móvil (Liu y col., 1992a; Liu y col., 1992b; Hawthorne y col., 1994; Yang y col., 1995; Smith y Burgess, 1997).

La cromatografía de líquidos con alta temperatura (HTLC) está teniendo una gran aceptación en los últimos años debido a sus ventajas sobre la HPLC convencional (Yang y col., 1998; Chen y Horvath 1995; Fields y col., 2001; Li y col., 1997d; Miller y Hawthorne, 1997; Smith y Burgess, 1997; Yan y col., 2000; Trones y col., 1999).

1.5.2. Ventajas de la HTLC sobre la HPLC convencional.

En los últimos tiempos se ha demostrado que pequeños incrementos en la temperatura pueden producir mejoras drásticas, tanto en la eficacia como en la velocidad de la separación mediante HPLC. Las elevadas temperaturas utilizadas para conseguir amplias mejoras en la velocidad de análisis, predicha por algunos autores años atrás, principalmente, dan lugar a tres efectos: disminución de la viscosidad, incremento de la velocidad de difusión de los analitos y

cinéticas más rápidas (Chen y Horvath, 1995). La primera de las ventajas se debe a que la disminución de la viscosidad de la fase móvil, debido al incremento de la temperatura, permite utilizar velocidades de flujo mayores sin que se produzcan incrementos en la presión del sistema, y así, reducir los tiempos de análisis (Smith y Burgess, 1997). El segundo efecto viene dado porque cuando se utilizan altas temperaturas, la velocidad de difusión de los analitos se incrementa, tanto en el interior como en el exterior de los poros del material de relleno, y por lo tanto la disminución de eficacia asociada con el incremento de la velocidad de flujo es mínima. Por último, a elevadas temperaturas, las cinéticas de las interacciones entre los analitos y la fase estacionaria son más rápidas. Todo esto contribuye a que los tiempos de análisis de todos los analitos sean menores y a menudo se reduzcan o eliminen las colas en los picos cromatográficos. Otra ventaja importante es que, a temperaturas elevadas, el agua puede ser usada como eluyente de polaridad media en cromatografía en fase inversa, como una alternativa a los eluyentes acuosos con modificadores orgánicos que se utilizan a temperatura ambiente (Smith y Burgess, 1997; Yan y col., 2000; Trones y col., 1999). Usando solamente agua como eluyente, también podemos evitar algunos problemas como toxicidad, inflamabilidad y altos costes relacionados al uso de disolventes orgánicos. El empleo de bajos contenidos de modificadores orgánicos permite el acoplamiento de esta técnica con bioensayos.

Un incremento de la temperatura de elución de unos 10-20 °C tiene un gran efecto sobre la forma de los picos, aumentando la eficacia, pudiendo resolverse analitos que sólo se separan como un hombro a temperatura ambiente. Un incremento desde la temperatura ambiente hasta 50-60 °C permite disminuir el tiempo de análisis a la mitad. Si elevamos la temperatura hasta los 100 °C, aproximadamente, es posible disminuir los tiempos de análisis alrededor de 5 veces. Esto permite, además, que el tiempo de equilibrado de la columna sea mucho menor lo que permite realizar un mayor número de análisis (ZirChrom Separations, Inc., 2002). La HTLC es, por tanto, una poderosa herramienta de separación.

Durante años el control de la temperatura de la columna cromatográfica, en cromatografía de líquidos, ha sido una variable poco tenida en cuenta, a excepción de su control para aumentar la reproducibilidad de los tiempos de retención en aplicaciones concretas y no como variable para incrementar el poder de separación en los métodos desarrollados por HPLC (Li, 1998). Esto es debido a que un cambio en el factor de capacidad o factor de retención de la columna puede ser fácilmente realizado por variación en la composición de la fase móvil y, además, la mayoría de las columnas basadas en sílice no son térmicamente estables (Yang y col., 1998) y sólo pueden ser usadas a temperaturas ligeramente superiores a la ambiente (Li y Carr, 1997a). En general,

estas columnas permiten un incremento máximo de la temperatura de 30-40 °C por encima de la temperatura ambiente (Fields y col., 2001). En un trabajo reciente (McCalley, 2000) se ha comprobado que se producen grandes incrementos en la eficacia de la separación de compuestos básicos a altas temperaturas. Los autores sugieren que los compuestos básicos podrían ser analizados a altas temperaturas y que habría que desarrollar nuevas columnas que fuesen estables a altas temperaturas. Debido a la disponibilidad, en la actualidad, de columnas térmicamente estables, el uso de la temperatura como variable de separación, para mejorar la selectividad y la velocidad de separación, está incrementándose últimamente.

En los últimos años, se han desarrollado fases estacionarias de alta estabilidad térmica basadas en zirconio, como los soportes de HPLC en fase inversa (RP-HPLC) de polibutadieno (Yan y col., 2000; Li y Carr 1996; Sun y Carr, 1995) y de poliestireno recubiertos de zirconio. Se han realizados varios estudios sobre la eficacia, selectividad y propiedades termodinámicas a altas temperatura, del polibutadieno recubierto de zirconio (PBD-ZrO₂) (Li y col., 1997d; Li y Carr, 1997a; Sun y Carr, 1995; Li y Carr, 1997b; Li y Carr, 1997c; Dolan, 2002). Con estas columnas, los tiempos de análisis se pueden mejorar en un amplio rango, utilizando temperaturas y velocidades del flujo altas (350 °C y 1 mL/min., respectivamente), con unas pequeñas pérdidas de resolución en comparación con la HPLC convencional operando a velocidades del flujo normales (Yang y col., 1998; Smith y Burgess, 1997; Sun y Carr, 1995).

Las altas temperaturas pueden mejorar la eficacia de la columna hasta en un 30%, teniendo lugar esta mejora, principalmente, en la región de velocidad de flujo lineal más alta (Li y col., 1997d). A una velocidad de flujo fija, la eficacia de la columna a temperaturas bajas es mejor que a temperaturas altas (ecuación 1.5-1). Esto se debe a que la difusión longitudinal molecular (término B) es más pronunciada a altas temperaturas y a bajas velocidades de flujo, debido a la interacción de moléculas con las paredes de la columna, dando como resultado, según la ecuación de Van Deemter, una menor eficacia a altas temperaturas. En la región de velocidad de flujo lineal alta, en donde la velocidad de transferencia de masa (término C) es mayor, la contribución del término B no es significativa. Debido a esto, es conveniente operar sobre las columnas a altas velocidades de flujo y temperaturas altas, de tal manera que no sólo se mejorará la velocidad de separación, sino que también incrementará la eficacia de la columna debido a la minimización de la contribución de la difusión longitudinal.

Ecuación de Van Deemter

$$HETP = A + B/\mu + C\mu$$

HETP= Altura de plato teórico.

A=Difusión de Eddy (camino de difusión múltiples).

B=Difusión Longitudinal.

C=Velocidad de transferencia de masa entre las fases y el analito.

μ = Velocidad lineal del flujo de la fase móvil.

Ecuación 1.5-1

1.5.3. Comportamiento de la fase móvil en HTLC.

El agua sobrecalentada puede usarse en HTLC en fase inversa como una alternativa a las mezclas metanol-agua o acetonitrilo-agua a temperatura ambiente. Su polaridad puede ser controlada, dentro de un rango, simplemente calentándola con suficiente presión para mantenerla en estado líquido (Yang y col., 1998). La constante dieléctrica del agua pura a 50 °C es similar a la de una mezcla metanol-agua o acetonitrilo-agua (10:90, v/v), mientras que es bastante menor que la del 100% de metanol o acetonitrilo a 250 °C (figura 1.5-1).

Dos parámetros adicionales de la fase móvil que controlan las separaciones en fase líquida son la tensión superficial del disolvente y la viscosidad. Una disminución en la tensión superficial reduce la retención (en fase inversa) de los analitos, y disminuyendo la viscosidad se produce una mejor transferencia de masa, obteniéndose mejores eficacias cromatográficas. El agua, a temperatura ambiente, tiene, relativamente, una alta tensión superficial y una viscosidad bastante alta. Calentando el agua a 250 °C se reduce la tensión superficial hasta alcanzar, aproximadamente, el mismo valor que presentan soluciones de metanol o acetonitrilo (figura 1.5-2) y se reduce la viscosidad del agua bastante más que en las dos soluciones mencionadas (Yang y col., 1998), (figura 1.5-3).

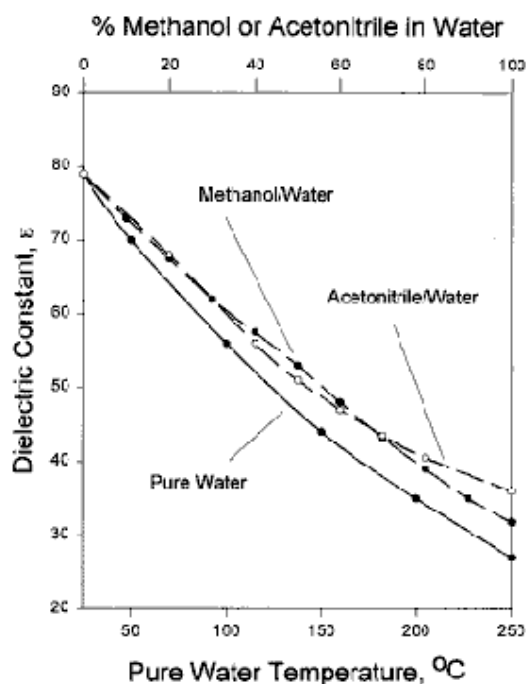


Figura 1.5-1. Control de la polaridad del disolvente (constante dieléctrica) por cambios de temperatura a presión constante (5 MPa) con agua pura comparada con agua mezclada con metanol o acetonitrilo a 25 $^{\circ}\text{C}$ y presión ambiente (Yang y col., 1998).

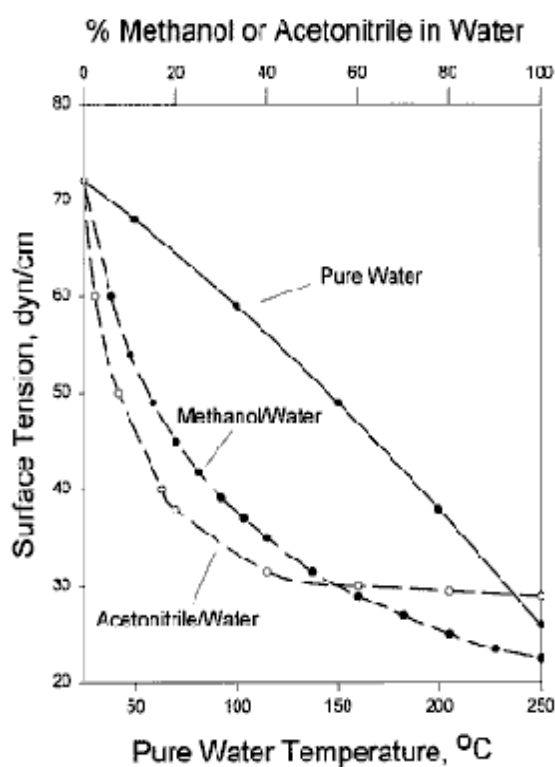


Figura 1.5-2. Control de la tensión superficial del disolvente por cambios de temperatura a presión constante (5 MPa) con agua pura comparada con agua mezclada con metanol o acetonitrilo a 25 $^{\circ}\text{C}$ y presión ambiente (Yang y col., 1998).

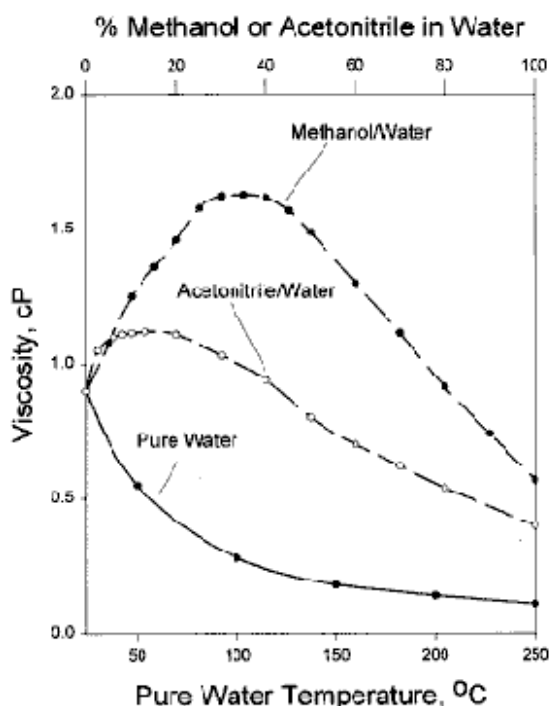


Figura 1.5-3. Control de la viscosidad del disolvente por cambios de temperatura a presión constante (5 MPa) con agua pura comparada con agua mezclada con metanol o acetonitrilo a 25 °C y presión ambiente (Yang y col., 1998).

1.5.4. Modificaciones de un equipo de HPLC para operar a altas temperaturas.

Cuando se trabaja con altas temperaturas es necesario utilizar un horno en el cual se introduce la columna y el tubo capilar de entrada a la columna, para proporcionar la temperatura necesaria para el análisis. Se necesita mantener suficiente presión en el sistema para prevenir que la fase móvil entre en ebullición. Esta ebullición puede causar daños al sistema y puede ser una fuente de peligro. Las fluctuaciones en el pulso de la señal del detector son causadas por la formación de burbujas de gas en el eluyente. Sin embargo, la alta presión en una columna cromatográfica produce un aumento de los puntos de ebullición de los disolventes, de tal modo que el burbujeo en el interior de la fase móvil no ocurre. Por debajo de 80 °C, no es necesario modificar el equipo de HPLC convencional para operar con seguridad. Los tubos que conectan la columna y el detector y los que van de éste al desecho son suficientes para enfriar la fase móvil hasta temperatura ambiente. Trabajando alrededor de los 100 °C, se necesita adicionar al sistema un regulador de presión, después del detector, para mantener unos 3 MPa de presión sobre el sistema, lo cual es, generalmente, suficiente para prevenir la formación de burbujas. Una presión de unos 3 MPa también puede ser soportada por cualquier detector, pero no todos los

detectores pueden utilizarse con presiones altas. A temperaturas superiores a 150 °C, es importante enfriar la fase móvil que sale de la columna antes de llegar al detector.

1.5.5. Aspectos a controlar debidos a la temperatura.

Desde los comienzos del empleo de esta técnica, han existido tres retos principales para poner en práctica la HTLC. Estos son:

- ✦ Estabilidad térmica de la columna.
- ✦ Anchura de picos por desajustes térmicos.
- ✦ Estabilidad térmica de los analitos.

La temperatura elevada puede usarse con columnas de HPLC convencionales para incrementar la eficacia, pero se reduce drásticamente el tiempo de vida de la columna. A 60 °C, muchas de las columnas que se basan en la sílice se degradan muy rápidamente, a menos que se elijan las condiciones de operación y las soluciones tampón cuidadosamente. Para conseguir una vida de la columna buena, se deben utilizar columnas que estén basadas en soportes estables térmicamente, tal como el zirconio, de los cuales se hablará más adelante.

El ensanchamiento de las bandas debido a desajustes térmicos es la distorsión de los picos cromatográficos causada por la desigualdad de la temperatura a través del diámetro de la columna (figura 1.5-4). Este fenómeno es causado por un mal diseño en el calentamiento de la columna, debido a que no se asegura que la temperatura de la fase móvil a la entrada de la columna sea igual a la temperatura del interior de la misma. Para evitar esto, el tubo capilar que lleva el eluyente hacia la columna, debe calentarse a la misma temperatura a la que se utilizará la columna, introduciéndolo en el horno junto a ésta.

La estabilidad de los analitos también puede ser un problema cuando se emplea la HTLC. Para ésta, los analitos deben ser térmicamente estables, al menos, durante el periodo de tiempo que dura el análisis. Con flujos elevados, puesto que el tiempo de exposición de los analitos a altas temperaturas disminuye, la probabilidad y el grado de degradación de los analitos en el interior de la columna disminuye de forma considerable (Thompson y col., 2001; Thompson y Carr, 2002).

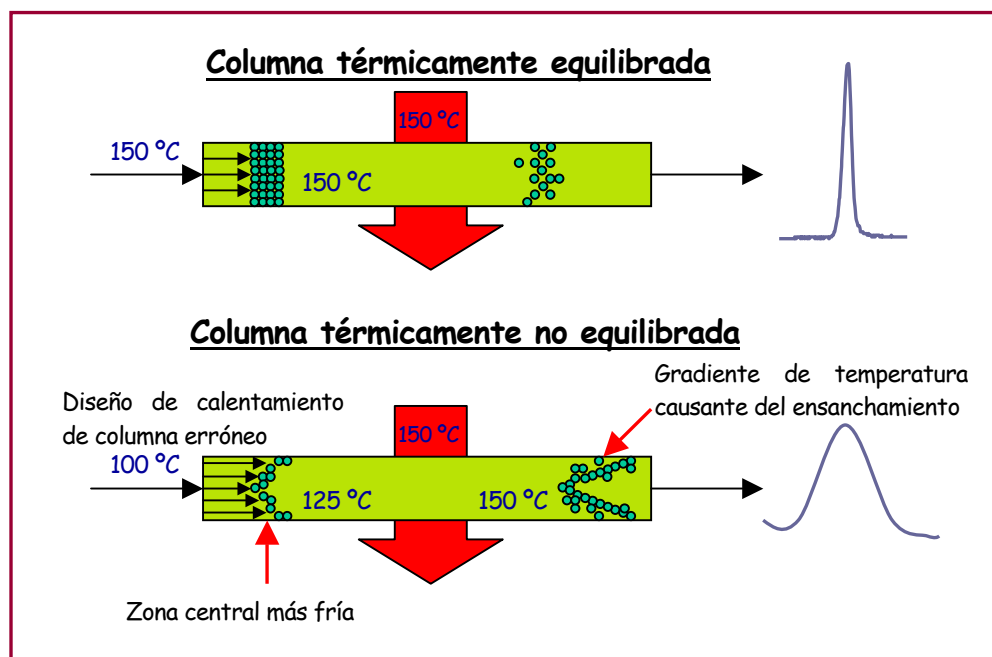


Figura 1.5-4. Ensanchamiento de bandas debido a desajustes térmicos.

1.5.6. Columnas de cromatografía de líquidos de alta temperatura.

Las fases estacionarias de HPLC poliméricas, de alúmina o de sílice, ampliamente usadas hoy en día, presentan una pobre resolución bajo algunas condiciones tales como alto pH de la fase móvil (>pH 8) o elevadas temperaturas de columna. Alternativamente, el zirconio (ZrO_2) es químicamente estable en todo el rango de pH (1-14), y es térmicamente estable. La alta estabilidad del zirconio y su selectividad cromatográfica lo hace adecuado para usarlo en HTLC.

La primera ventaja del zirconio sobre los rellenos poliméricos o de sílice, es su alta estabilidad térmica y química. A diferencia de la sílice, el zirconio es completamente estable en todo el rango de pH y a temperaturas altas como 200 °C. En comparación a las fases estacionarias poliméricas, el zirconio no se contrae ni se expande en función del contenido orgánico de la fase móvil o de la fuerza iónica. Esta alta estabilidad da lugar a una columna que puede ser limpiada en condiciones extremas (ácidas o básicas), y también permite un mayor tiempo de vida de la misma. La columna permanecerá estable a altas temperaturas permitiendo análisis más rápidos y menor necesidad de modificadores orgánicos (ZirChrom Separations, Inc).

Algunas de las columnas que utilizan el zirconio en el relleno son la DiamondBond®-C₁₈ y la Zirchrom®-PBD (ZirChrom Separations, Inc). La DiamondBond®-C₁₈ utiliza una tecnología propia de enlace covalente para enlazar las cadenas C₁₈ a la superficie de carbono dando una importante estabilidad a la columna para aplicaciones a alta temperatura. Las cadenas se encuentran recubiertas de zirconio. Esta columna presenta una selectividad intermedia entre las de octadecilsilice (ODS) y las de los soportes de carbono no enlazados que son usados en fase inversa, y su principal utilidad es con compuestos ácidos y para aplicaciones de LC-MS.

La columna Zirchrom®-PBD presenta un relleno de polibutadieno (PBD) con un recubrimiento de zirconio sobre una fina capa de polímero. La selectividad química de las columnas de Zirchrom®-PBD es similar a la de una convencional de sílice C₈ o C₁₈ para analitos no iónicos. Sin embargo, para analitos ionizables, existe la posibilidad de que se produzcan interacciones secundarias, lo cual puede usarse para cambiar la selectividad química de la columna por simple adición de aditivos a la fase móvil. Por el contrario, si el aditivo apropiado no se añade a la fase móvil, el resultado será un peor perfil de los picos o en casos extremos la completa adsorción de los analitos a la columna. Los tres tipos de sitios cromatográficos más importantes en la superficie del relleno de zirconio son, el ácido de Brönsted, la base de Brönsted y el ácido de Lewis (figura 1.5-5). Sin embargo, con fines prácticos, los sitios de tipo ácido de Lewis son los dominantes en la superficie química del zirconio debido a la facilidad con la que estos sitios pueden adsorber los constituyentes de la fase móvil para formar una capa quimiadsorbida en la superficie de zirconio. Esto puede causar resultados cromatográficos pobres, debido a la posibilidad de que un analito sea adsorbido en estos sitios de forma irreversible, cuando no se trabaja en las condiciones adecuadas (ZirChrom Separations, Inc)

Otra columna frecuentemente utilizada es la PRP-1, que tiene como relleno de empaquetamiento el poli(estiren-divinilbenceno), un relleno polimérico que se puede utilizar en un gran número de aplicaciones, similares a las columnas C₈ y C₁₈ de fase inversa, siendo mejor que estas cuando existen dificultades en el análisis: muestras a pH altos (>8), muestras reactivas o termolábiles, fases móviles con porcentaje acuoso alto (80-100% de agua) o con reactivos formadores de pares iónicos. El relleno es estable hasta presiones por encima de 30 MPa y los entrecruzamientos previenen que el relleno se expanda o se contraiga, lo cual es común en otras columnas poliméricas. Este relleno es estable en todo el rango de pH (0-14). Presentan una mejor recuperación de la muestra que las columnas basadas en sílice y tienen una excelente durabilidad, ya que son estables a cualquier concentración de agua o de disolvente orgánico. A diferencia de las columnas de sílice C₈ y C₁₈, la columna PRP-1 no presenta enlaces lábiles y, por

tanto, no se produce hidrólisis de ésta, manteniendo la columna sus características de resolución durante más tiempo que cualquiera de las columnas de C_8 y C_{18} .

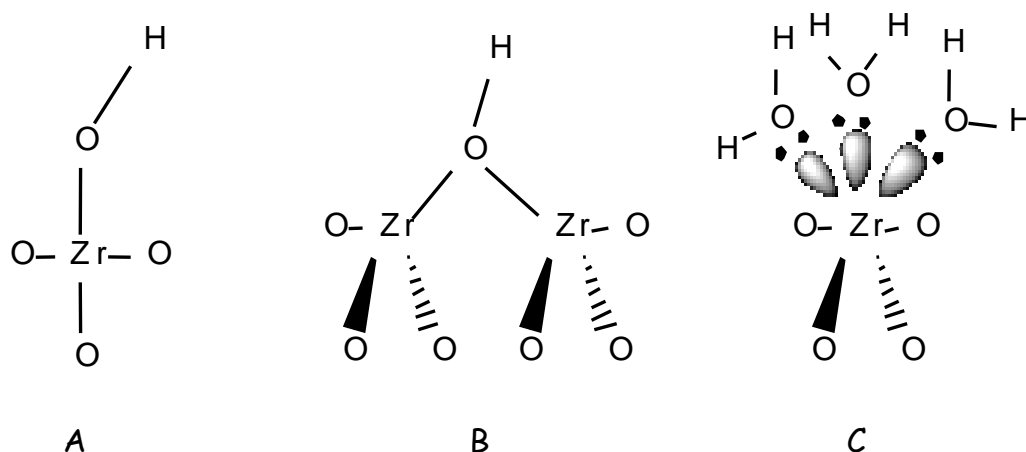
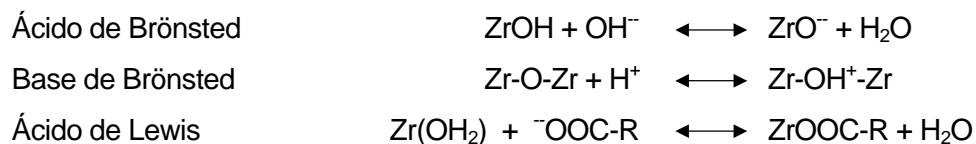


Figura 1.5-5. Estructura química de las especies mayoritarias presentes en la superficie de zirconio; ácido de Brönsted (A), base de Brönsted (B) y ácido de Lewis (C) (intercambio de ligandos).



Otro relleno de fase inversa utilizado es el Pathfinder AP, material de empaquetamiento que conjuga la fuerza de las columnas de HPLC basadas en polímeros y en gel de sílice. Estas columnas presentan características de ambas, son químicamente inertes como las poliméricas y presentan una alta estabilidad y eficacia como las de gel de sílice. Con este relleno se eliminan los efectos desfavorables del silanol en las separaciones en HPLC. Se puede utilizar con 100% de agua y a elevadas temperaturas, incrementando la selectividad debido a la combinación de la fase inversa y a los mecanismos de interacción polar.

1.5.7. Bioensayos acoplados a la HTLC.

En la industria farmacéutica, entre otras, los bioensayos son ampliamente utilizados. Un gran número de componentes son ensayados respecto a ciertas moléculas diana, en búsqueda del componente activo para la enfermedad objeto de investigación. Los métodos de ensayo son, generalmente, una combinación de un micro-bioensayo con técnicas de detección de radioactividad, fluorescencia o ultravioleta-visible. Estos métodos de detección requieren marcadores en cantidades suficientes, cuya producción es complicada y cara. Otra desventaja de los micrométodos de ensayo es su incompatibilidad con muestras constituidas por varios compuestos, haciendo imposible la identificación de los compuestos responsables de la bioactividad (de Boer y col., 2004).

Debido a que el fraccionamiento e identificación de las muestras, generalmente, requiere un trabajo previo de preparación y purificación de la muestra, el cual consume bastante tiempo y es un proceso laborioso, se han desarrollado sistemas de detección en línea de HPLC de flujo continuo, en el cual las reacciones bioquímicas están integradas postcolumna (de Boer y col., 2004). Los sistemas de detección más utilizados están basados en la espectrometría de masas mediante la ionización por electrospray de los diferentes compuestos de la muestra (ESI-MS). La ESI-MS permite obtener información estructural de los compuestos bioactivos, lo cual ayuda a su identificación.

La combinación del bioensayo y la MS, requiere una composición de los disolventes compatibles para ambos. Muchos de los modificadores orgánicos interfieren en la reacción enzimática del bioensayo y disminuyen la señal de respuesta. Los ensayos enzimáticos son ampliamente realizados en soluciones que contienen soluciones tampón de sales no volátiles tales como, HEPES, TRIS, solución de tampón fosfato (PBS) y aditivos que preservan la actividad y estabilidad enzimática y para prevenir enlaces superficiales no específicos de las proteínas presentes en el ensayo. Sin embargo, las sales no volátiles contaminan la fuente de iones del espectrómetro de masas, lo cual produce una disminución en la resolución del MS. La cantidad de aditivos en la solución tiene que ser lo más pequeña posible, puesto que producen una supresión en la ionización en ESI-MS (Bonfiglio y col., 1999). Por estas razones, los aditivos y soluciones tampón de sales no volátiles utilizados comúnmente, son omitidos en este estudio.

A modo de resumen se puede decir que las ventajas más importantes que presenta el bioensayo acoplado a la HTLC son la utilización de disolventes que no necesitan modificadores

orgánicos, lo cual hace que sea compatible para trabajar con enzimas, mejor separación de la mezcla de inhibidores presentes en la muestra, con lo cual es posible la identificación de cada uno de ellos en un mismo ensayo, menor cantidad de muestra y de disolventes, dando lugar a análisis más económicos y tiempos de análisis menores.

Materiales y Métodos

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Muestras.

Todos los vinos estudiados han sido centrifugados durante 15 minutos a 5000g y 10 °C, en una centrifuga Avanti J-25 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA), al recibirse en el laboratorio, e inmediatamente refrigerados hasta su análisis. Cada ensayo analítico se ha realizado, al menos, por duplicado.

2.1.1. Vino tinto de la variedad Tempranillo.

Se ha partido de 10000 litros de un vino tinto de la variedad de uva Tempranillo, elaborado industrialmente en una bodega de la Denominación de Origen (D.O.) de Navarra, elaborado en un depósito de acero inoxidable. Después de la fermentación alcohólica, parte de este vino (aproximadamente 7000 litros) ha sido sometido a fermentación maloláctica, junto a las lías de levadura, en depósitos de acero inoxidable (vino FML-D). Se han realizado diferentes tratamientos postfermentativos, después de que esta segunda fermentación haya terminado, a una parte del vino para eliminar las lías. Estos tratamientos han sido, trasiego (vino D-SL-T), trasiego y clarificación con albúmina y bentonita (vino D-SL-C) y trasiego, clarificación y estabilización por frío y filtrado por tierras (vino D-SL-E). Estos vinos se han transferido, posteriormente a su tratamiento, a barricas de roble y se han considerado como vinos control. Otra parte del vino FML-D ha sido transferido a barricas de roble sin eliminar las lías (vino D-L), para realizar el envejecimiento. El resto del vino (aproximadamente 3000 litros) se ha sometido a la fermentación maloláctica, junto a las lías de levadura, en barricas de roble (vino FML-B), realizando el envejecimiento junto a las lías (vino B-L), en dichas barricas.

Durante el envejecimiento con las lías, algunos de los vinos han sido agitados semanalmente (vinos D-L-A_s y B-L-A_s), otros han sido removidos mensualmente (vinos D-L-A_m y B-L-A_m) y a otros no se les ha realizado ningún tipo de agitación (vinos D-L-A₀ y B-L-A₀). La fermentación maloláctica se ha realizado mediante inoculación de una bacteria ácido láctica comercial, *Oenococcus oeni* (ITV 04 A1) proporcionada por OenoFrance (Rueil-Malmaison, Francia). Las muestras analizadas y su descripción se muestran en la tabla 2.1-1.

Tabla 2.1-1. Procedimientos tecnológicos realizados en la elaboración de los vinos y las claves asignadas a cada muestra de vino.

V inicial	FML-D	Vino envejecido sin lías	D-SL-T (trasegado) D-SL-C (trasegado y clarificado) D-SL-E (trasegado, clarificado y estabilizado por frío y filtrado por tierras)
		Vino envejecido con lías	D-L-A ₀ (sin agitación) D-L-A _s (agitación semanal) D-L-A _m (agitación mensual)
	FML-B		B-L-A ₀ (sin agitación) B-L-A _s (agitación semanal) B-L-A _m (agitación mensual)

Las barricas utilizadas fueron barricas nuevas de roble francés (*Quercus sessilis*) de 225 litros. Durante el envejecimiento, se utilizaron cuatro barricas en cada uno de los diferentes procesos tecnológicos realizados a los vinos. Las muestras se tomaron de cada una de las barricas y se mezclaron y homogeneizaron antes de los análisis. Fueron analizadas un total de 51 muestras de vino. Las tomas de muestra se realizaron antes y después de la FML (Vino Inicial, FML-D y FML-B), después de cada uno de los tratamientos tecnológicos (B-L-A₀/A_s/A_m, D-L-A₀/A_s/A_m y D-SL-T / D-SL-C / D-SL-E) y a los 3, 6, 9, 12 y 14 meses de envejecimiento

2.1.2. Vinos espumosos de las variedades Malvar y Albillo.

Se ha partido de un vino base de la variedad Malvar y de otro de la variedad Albillo, elaborados en la bodega experimental del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA), (Finca El Encín), acogido a la subzona de Arganda (Madrid) de la D.O. Vinos de Madrid. Se han obtenido tres lotes de vinos espumosos de cada una de las variedades de uva, inoculando, en la realización de los tirajes correspondientes, tres cepas de levaduras diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, una de ellas comercial EC-1118 (Lallemand Spain S.A.), como control, y las otras dos de la colección de levaduras del IMIDRA, *Saccharomyces cerevisiae*, cepas 01 y 02, que han sido previamente seleccionadas como levaduras adecuadas para la elaboración de vinos espumosos. La segunda fermentación y el envejecimiento se han realizado a la temperatura de la bodega del IMIDRA (alrededor de 16 °C)

con las botellas puestas en “rima”. Se han tomado muestras de los vinos al finalizar la segunda fermentación y después de nueve y doce meses de envejecimiento en botella con las levaduras. Puesto que la segunda fermentación y el envejecimiento de los vinos tienen lugar en botellas individuales, para las determinaciones analíticas se ha mezclado el contenido de cuatro botellas del mismo lote y se han homogeneizado antes del análisis.

2.1.3. Vinos comerciales.

Se han analizado un total de 33 vinos comerciales, 9 de ellos blancos de mesa, 9 tintos de mesa y 15 espumosos. Los vinos blancos de mesa procedían de Madrid y de Valladolid, siendo obtenidos a partir de las variedades de uva Airén, Verdejo y Sauvignon Blanc. Los vinos tintos han sido elaborados en La Rioja, Madrid y Castilla-La Mancha con la variedad de uva Tempranillo. Los vinos espumosos se elaboraron en Barcelona y Madrid, mediante el método tradicional, con las variedades Macabeo, Xarel.lo y Parellada.

2.1.4. Autolisado de levaduras.

Se ha utilizado una cepa comercial del género *Saccharomyces bayanus* (EC 1118) en forma de Levadura Seca Activa (L.S.A.), suministrada por Lallemend S.A. (Madrid, España). La levadura se ha rehidratado siguiendo el método descrito por (Martínez-Rodríguez y col., 2001). Las levaduras se han resuspendido y se han lavado 3 veces con una solución de cloruro de sodio 0,9% (p/v). Entre cada lavado las levaduras han sido centrifugadas a 10000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se han suspendido en un medio vínico modelo, cuya composición ha sido: Etanol, 10% (v/v); ácido tartárico, 4 g/L; ácido málico, 3 g/L; ácido acético, 0,1 g/L; sulfato potásico, 0,1 g/L; sulfato magnésico, 0,025 g/L. El pH ha sido ajustado a 3 con una disolución 0,1 N de hidróxido sódico. La concentración final de levadura en el medio vínico ha sido de 1×10^8 levaduras/mL. La autólisis ha sido realizada incubando la suspensión de levaduras en un agitador orbital (modelo G-25. New Brunswick Scientific Co. Edison, New Jersey, USA) a 30 °C, con una agitación de 150 r.p.m. Se ha realizado la toma de muestra a diferentes tiempos (6, 24, 48, 121 y 144 horas) y cada una de ellas se ha centrifugado a 10000 g durante 10 minutos.

2.2. Determinaciones Cuantitativas.

2.2.1. Cuantificación del nitrógeno total.

La determinación del nitrógeno total ha sido realizada mediante el método Kjeldahl, con un sistema de digestión Tecator y un autoanalizador Kjeltex 1030 (Tecator AB, Höganäs, Suecia).

2.2.2. Cuantificación del nitrógeno de compuestos nitrogenados de alto peso molecular.

La concentración de los compuestos nitrogenados de alto peso molecular (HMWN) ha sido determinada por medio del método de Bradford (Bradford, 1976), el cual se basa en la reacción de dichos compuestos con el reactivo azul de comassie G-250. Mediante este método se determinan los compuestos de peso molecular mayor de 3000 Da. La absorbancia se mide a 595 nm, a los 15 minutos de adicionar el reactivo sobre la muestra. Los resultados se han expresado en mg de nitrógeno perteneciente a compuestos de alto peso molecular por litro. La seroalbumina bovina (BSA) se ha utilizado como solución patrón. En la expresión de los resultados se ha tenido en cuenta tanto el peso molecular de la BSA (66432 g/mol) como el número de átomos de nitrógeno presentes en la molécula (10276 g/mol).

2.2.3. Cuantificación del nitrógeno de los aminoácidos libres.

Se ha llevado a cabo mediante el método descrito por Doi y col. (1981) (Método C, Ninhidrina-Cd), el cual se basa en la reacción de los grupos amino de los aminoácidos libres en medio ácido con una solución etanólica de ninhidrina con CdCl_2 . La absorbancia se mide a 507 nm.

2.2.4. Cuantificación del nitrógeno de los aminoácidos libres más péptidos.

Se ha seguido el método descrito por Doi y col. (1981) (Método Ninhidrina Convencional), basado en la reacción de los grupos α - y ϵ - amino primarios libres de péptidos y aminoácidos al reaccionar con una solución de ninhidrina con SnCl_2 . La absorbancia se mide a 570 nm.

2.2.5. Cuantificación del nitrógeno de péptidos.

2.2.5.1. Estudio de la fracción nitrogenada.

La concentración del nitrógeno de los péptidos se ha determinado por la diferencia entre el nitrógeno total (punto 2.2.1.) y la cantidad de nitrógeno correspondiente a las proteínas y a los aminoácidos libres (puntos 2.2.2. y 2.2.3., respectivamente).

2.2.5.2. Estudio de la bioactividad.

La concentración del nitrógeno de los péptidos se ha determinado por la diferencia entre el nitrógeno de los aminoácidos libres más péptidos (punto 2.2.4.) y el nitrógeno de los aminoácidos libres (punto 2.2.3.).

Para las determinaciones de los puntos 2.2.2., 2.2.3. y 2.2.4. se ha utilizado un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA), y la leucina (14 g de nitrógeno por cada 131,2 g de leucina) ha sido utilizada como compuesto patrón.

2.2.6. Análisis de aminoácidos libres por cromatografía de líquidos de alta eficacia.

El análisis de los aminoácidos libres se ha realizado por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC), mediante una reacción de derivatización precolumna, con ortoftaldialdehído (OPA) en presencia de 2-mercaptoetanol, según el método descrito por González de Llano y col. (1991). Las reacciones se han realizado consecutivamente de forma automatizada.

Para el análisis se ha empleado un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia, compuesto por una bomba 600 Controller, un desgasificador en línea y un inyector automático WISP 717 Plus (Waters Corporation, Milford, MA, USA) y un detector de fluorescencia de longitud de onda variable HP 1046-A (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, USA), conectados a un ordenador personal con el programa Millenium v32 de Waters, con el que se ha controlado el sistema cromatográfico y se ha realizado la adquisición y el procesamiento de los datos. La detección de los OPA derivados se ha realizado a una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 425 nm. Se ha utilizado una precolumna Nova-Pak C₁₈ de Waters, 20 mm de

longitud x 3,9 mm de d.i., 60 Å, 4 µm y una columna Nova-Pak C₁₈ de Waters, 150 mm de longitud x 3,9 mm de d.i., 60 Å, 4 µm.

Para la preparación del reactivo derivatizante orto-ftaldialdehído-mercaptoetanol (OPA-MCE), se disuelven 200 mg de OPA en 9 mL de metanol, y se llevan a 10 mL con tampón borato 400 mM, pH 10. Se adicionan 160 µL de 2-mercaptoetanol. La solución se almacena en frío durante 24 horas antes de su uso, y posteriormente se filtra con un filtro PVDF Millex-HV (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) de 0,45 µm de tamaño de poro.

Se han utilizado dos eluyentes, el eluyente A formado por metanol/tampón fosfato sódico (10 mM, pH 7,3)/tetrahidrofurano (19:80:1) (v:v:v), y el eluyente B formado por metanol/tampón fosfato sódico (10 mM, pH 7,3) (80:20) (v:v).

Para la formación automática precolumna de los compuestos OPA derivados, se inyectan 12 µL de la disolución de OPA-MCE, los cuales quedan retenidos en el bucle del inyector, y al minuto se inyectan 20 µL de muestra convenientemente diluida en tampón borato 400 mM, pH 10. Las condiciones iniciales del gradiente, con flujo de 0,1 mL/min, permiten la reacción del OPA con la muestra. El gradiente lineal que se ha realizado para la elución de los compuestos se muestra en la tabla 2.2-1. El análisis cuantitativo, realizado por duplicado, se ha llevado a cabo utilizando el método del calibrado externo, obteniendo una recta de calibrado para cada uno de los aminoácidos determinados. Las muestras, previamente al análisis, han sido filtradas con un filtro PVDF Millex-HV (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) de 0,45 µm de tamaño de poro.

2.2.7. Análisis de aminoácidos totales por cromatografía de líquidos de alta eficacia.

El análisis de los aminoácidos totales se ha realizado por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC), realizando, previamente, la hidrólisis ácida de las muestras. El volumen de muestra para la hidrólisis ha sido de 500 µL, añadiéndose a ésta, 500 µL de HCl concentrado (concentración final, 6M) y 10 µL de ácido tioglicólico, en una atmósfera de N₂ durante 24 horas a 110 °C. Posteriormente, la muestra ha sido llevada a sequedad con un equipo de concentración Büchi (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza), compuesto de Baño de Calor B-490, Rotavapor R-250 y controlador de Vacío V-800. A continuación, la muestra se reconstituye en 500 µL de tampón borato (400mM, pH 10) y los aminoácidos se analizan siguiendo el método descrito en el punto 2.2.6.

Tabla 2.2-1. Gradiente utilizado en la derivatización y separación de aminoácidos por RP-HPLC.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Eluyente A	Eluyente B
0,0	0,0	100	0
1,0	0,1	100	0
2,5	1,5	100	0
7,5	1,5	85	15
12,5	1,5	85	15
17,5	1,5	70	30
21,5	1,5	60	40
33,5	1,3	20	80
39,5	1,3	20	80

2.2.8. Análisis de aminas biógenas por cromatografía de líquidos de alta eficacia.

El análisis de las aminas biógenas se ha realizado por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC), utilizando el método descrito por Marcobal y col. (2005), mediante una reacción de derivatización precolumna, con ortoftaldialdehído (OPA) en presencia de 2-mercaptoetanol, dando lugar a un compuesto que se detecta mediante fluorescencia. Las reacciones se han realizado consecutivamente de forma automatizada.

Para el análisis de las aminas se ha empleado el mismo equipo y las mismas columnas descritas en el punto 2.2.6. Para la preparación del reactivo derivatizante ortoftaldialdehído-mercaptoetanol se disuelven 350 mg de OPA en 47,5 mL de metanol y se añaden 2,5 mL de 2-mercaptoetanol. La solución se ha almacenado en frío durante 24 horas antes de su uso, y posteriormente se ha filtrado con un filtro PVDF Millex-HV (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) de 0,45 μm de tamaño de poro. Se han utilizado dos eluyentes, el eluyente A formado por tampón fosfato sódico (10 mM, pH 8,3) y el eluyente B formado por un 1% de 2-octanol en acetonitrilo y eluyente A (70:30) (v/v).

Para la formación automática precolumna de los compuestos OPA derivados, se inyectaron, sucesivamente, 6 μL de tampón borato (400 mM, pH 10,5), 12 μL de la disolución de OPA-MCE y 16 μL de muestra, convenientemente diluida, los cuales quedaron retenidos en el

bucle del inyector durante dos minutos para que se produzca la reacción antes de llegar a la columna. El gradiente lineal utilizado para la elución de los compuestos se muestra en la tabla 2.2-2. El análisis cuantitativo se ha llevado a cabo utilizando el método del calibrado externo, obteniendo una recta de calibrado para cada una de las aminos determinadas. El patrón de calibrado empleado se ha preparado en etanol 10%. Los análisis han sido realizados por duplicado y las muestras han sido previamente filtradas con un filtro PVDF Millex-HV (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) de 0,45 μm de tamaño de poro.

Tabla 2.2-2. Gradiente utilizado en la derivatización y separación de aminos biógenas por RP-HPLC.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Eluyente A	Eluyente B
0,0	0,01	70	30
5,0	0,10	70	30
6,0	0,80	70	30
20,0	0,80	50	50
60,0	0,80	20	80

2.3. Aislamiento y caracterización de la fracción peptídica.

2.3.1. Concentración de la muestra.

Las muestras de vino se concentraron a vacío, a 40 °C, utilizando un equipo de concentración Büchi. Los volúmenes que se concentraron fueron de 450 mL para todas las muestras. El volumen final obtenido fue de 25 mL. En el caso de los autolisados no se realizó concentración.

2.3.2. Fraccionamiento del concentrado por cromatografía de líquidos en columna abierta (Sephadex LH-20). Obtención de la fracción de peso molecular menor de 4000 Da.

Se han aplicado 20 mL del concentrado de cada una de las muestras sobre una columna de Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), de 390 mm de longitud x 25 mm d.i., hinchada y empaquetada según las instrucciones del suministrador (figura 2.3-1). El fraccionamiento se ha realizado a temperatura ambiente en las mismas condiciones descritas por Acedo y col. (1994). El eluyente ha sido ácido acético/acetato amónico, 300 mM, pH 4. La velocidad del flujo utilizada es de 0,4 mL/min.

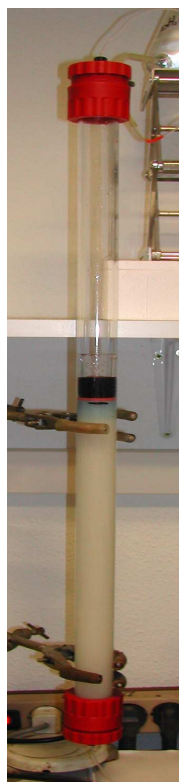


Figura. 2.3-1. Columna cromatográfica de exclusión molecular.

La introducción de la muestra y del eluyente se ha realizado utilizando una bomba HiLoad Pump P-50 de Amersham Biosciences. El eluido ha sido colectado en fracciones de 5 mL, mediante un colector LKB-FRAC 100 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). El volumen de exclusión se calcula utilizando una disolución de azul de dextrano y el tiempo de retención máximo se ha calculado mediante una disolución de triptófano (2 mg/mL). La detección ha sido realizada a 280 nm usando un detector 2138 Uvicord S (LKB, Uppsala, Suecia) y la adquisición de los datos se ha realizado mediante el software Gold System v8.1 de Beckman.

Se comenzaron a recoger las fracciones cuando el tiempo de elución coincidía con el del volumen de exclusión y se finalizó cuando el tiempo coincidió con el tiempo de retención del triptófano. Las muestras han sido recogidas en una sola fracción, la cual fue concentrada, posteriormente, hasta un volumen de 25 mL.

2.3.3. Fraccionamiento de la fracción menor de 4000 Da por cromatografía de líquidos en columna abierta (Cosmosil 140 C₁₈-OPN).

El fraccionamiento del concentrado obtenido a partir de la columna de Sephadex LH-20, se ha llevado a cabo mediante una columna de Cosmosil 140 C₁₈-OPN (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japón), de 300 mm de longitud x 10 mm d.i., hinchada y empaquetada según las instrucciones del suministrador. La muestra (20 mL) se inyecta mediante un superloop (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) de 50 mL, utilizando una bomba HiLoad Pump P-50 de Amersham Biosciences. El fraccionamiento se ha realizado a temperatura ambiente, utilizándose tres eluyentes diferentes. La fracción 1 eluye con agua, la fracción 2 con etanol al 10% y la fracción 3 con etanol absoluto, grado HPLC. La velocidad de flujo es de 2 mL/min, la detección se ha llevado a cabo con un detector 2138 Uvicord S de LKB a 280 nm y la adquisición de los datos se ha realizado con un ordenador personal, utilizando el software Gold System v8.1 de Beckman. Las fracciones se han recogido atendiendo a la monitorización del eluido, a 280 nm, interrumpiéndose cuando se ha alcanzado, de nuevo, la línea base. Posteriormente, las fracciones se concentran hasta 25 mL.

En el fraccionamiento del autolisado se aplican 25 mL a la columna. Los compuestos de alto peso molecular quedan retenidos en la cabeza de la columna, lo que permite que estos no estén presentes en ninguna de las dos fracciones recolectadas. Dichas fracciones han sido recogidas y concentradas hasta los 25 mL y, posteriormente, refrigeradas hasta su análisis.

2.3.4. Fraccionamiento por cromatografía de líquidos de alta eficacia semipreparativa en fase inversa.

Para el fraccionamiento de la fracción 2, obtenida como se describe en el punto anterior, se ha utilizado un equipo constituido por una bomba Waters 600 Controller, un inyector automático Waters 717 plus, un detector Waters 996 de fotodiodos alineados, un horno de Columna Waters a 35 °C y un ordenador personal. El control de los equipos, los datos obtenidos y su procesado se ha llevado a cabo mediante el programa Millenium v32 de Waters. El volumen de inyección ha sido de 500 µL y la columna utilizada ha sido Pre Nova-Pak HR C₁₈ de Waters, de 300 mm de longitud x 7,8 mm d.i., 60 Å, 6 µm. El eluyente A se ha preparado con 0,1% de ácido trifluoroacético en agua y el eluyente B con 0,1% de ácido trifluoroacético en agua:acetonitrilo (1:1). El fraccionamiento se ha realizado mediante un gradiente lineal de 0 a 12% de eluyente B, durante 70 minutos. El flujo utilizado ha sido de 4 mL/min.

2.3.5. Análisis de péptidos por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC).

En el análisis de los péptidos de las muestras directas y de las fracciones 1 y 2 obtenidas según el punto 2.3.3., se ha utilizado un equipo de HPLC analítico, formado por 2 bombas M 116 de Beckman, un mezclador de fases, un inyector automático Midas (Spark Holland, Emmen, Holanda), un detector M 168 de fotodiodos alineados de Beckman y un ordenador personal. El control de los equipos, la adquisición de datos y su procesado ha sido realizado con el software Gold Nouveau Chromatography Data System v1.0 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). Se ha utilizado una columna Nova-Pack C₁₈ de Waters, de 150 mm de longitud x 3,9 mm d.i., 60 Å, 4 µm. El eluyente A ha sido 0,1% de ácido trifluoroacético en agua y el eluyente B 0,1% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo. El gradiente se ha llevado a cabo por un incremento lineal desde 0 a 40% del eluyente B, durante 70 minutos. La velocidad del flujo ha sido de 1 mL/min. La detección se ha realizado a 214 y 280 nm y se obtienen los espectros entre 190 y 340 nm, cada 2 nm, a lo largo de todo el cromatograma. El volumen de inyección ha sido de 20 µL.

Todas las muestras utilizadas en los puntos 2.3.3., 2.3.4. y 2.3.5., fueron, previamente, filtradas con un filtro PVDF Millex-HV (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) de 0,45 µm de tamaño de poro.

2.4. Análisis de monosacáridos constituyentes de polisacáridos por cromatografía de gases.

Para la determinación del contenido en monosacáridos de los polisacáridos de las muestras, se ha procedido a la hidrólisis de las mismas, según el método descrito por (Castino, 1985). A 1 mL de muestra, se le añaden 0,5 mL de una disolución de 0,25 mg de mioinositol/mL (patrón interno) preparados con 70% de metanol y se introducen en una ampolla cerrada junto con 1 mL de ácido trifluoroacético 2 M y se calienta a 110 °C durante 24 horas. Una vez frío, el contenido se lleva a sequedad a presión reducida.

Para el análisis de los monosacáridos, obtenidos mediante la hidrólisis, se ha procedido a la obtención de los derivados sililados siguiendo la metodología descrita por (Troyano y col., 1991). La muestra se disolvió en 100 µL de piridina anhidra, y se le adicionaron 100 µL de trimetilsililimidazol, 100 µL de trimetilclorosilano, 100 µL de n-hexano y 200 µL de agua desionizada, agitando después de la adición de cada compuesto. Se han inyectado en el cromatógrafo de gases 2 µL, de la fase orgánica (hexano) de esta solución, en modo de split (1/40). Cada muestra se analizó por duplicado.

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y con un inyector split/splitless. La separación se llevó a cabo en una columna OV-101 metil silicona (Chrompack 5CB) de 25 m de longitud y 0,2 mm de diámetro interno. El control del equipo, la adquisición y el procesamiento de datos, se llevaron a cabo con el programa HP ChemStation. La separación se ha realizado con una temperatura del inyector y del detector de 270 °C y una temperatura inicial del horno de 175 °C durante 15 minutos. A continuación, con un gradiente de temperatura de 15 °C/min, se alcanzaron los 200 °C, que se mantuvieron durante 13 minutos, aumentándose la temperatura, a 30 °C/min, hasta alcanzar 290 °C, la cual se mantuvo durante 20 minutos. Como gas portador se empleó nitrógeno, con una presión de 0,1 MPa.

La identificación y el análisis cuantitativo de los distintos compuestos se han realizado por comparación de los tiempos de retención relativos al patrón interno de los compuestos presentes en las muestras, respecto a los de las soluciones de referencia. Para la cuantificación se ha seguido el método del patrón interno, realizándose una curva de calibrado para cada uno de los monosacáridos analizados.

2.5. Análisis Estadísticos.

Los métodos estadísticos utilizados para el análisis de todos los datos analizados han sido:

- Análisis de conglomerados, la distancia euclídea al cuadrado se ha usado como medida de semejanza entre las muestras, utilizándose el método de Ward como método de unión de las variables estandarizadas, para determinar el agrupamiento natural de las muestras.
- Análisis de componentes principales (CP) para detectar las variables que mejor clasifican las muestras y examinar la relación entre las variables analizadas.
- Análisis de la varianza (ANOVA) para la comparación de medias.
- Test de Scheffe y el test de Fisher-LSD para conocer las diferencias existentes entre las medias de aquellos factores que han resultado significativamente diferentes según los datos obtenidos del ANOVA.

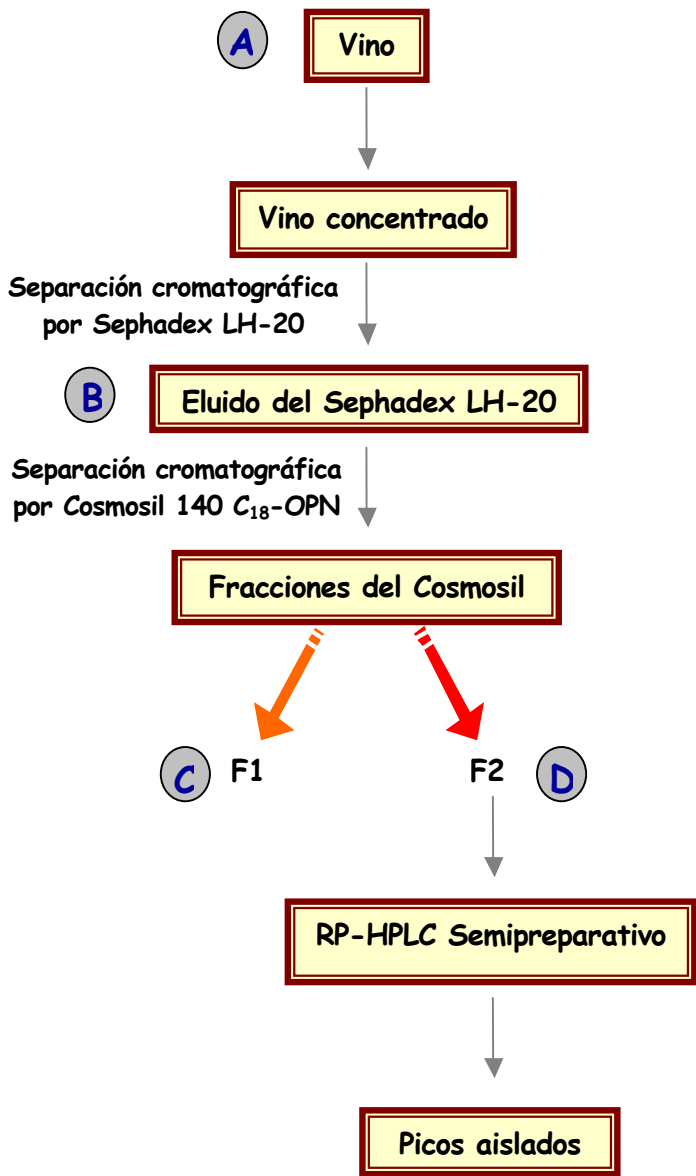
El programa utilizado para procesar los datos, mediante un ordenador personal, fue STATISTICA v.7.1 (StatSoft, Inc., 2005).

2.6. Esquema del fraccionamiento de los vinos para el estudio de la fracción peptídica.

El fraccionamiento de los vinos y las determinaciones realizadas a cada fracción y al vino inicial, se esquematizan en la figura 2.6-2.



**DETERMINACIONES
REALIZADAS**



- Nitrógeno Total
(A)
- Nitrógeno de alto peso molecular*
(A)
- Nitrógeno de aminoácidos libres
(A) (B) (C) (D)
- Nitrógeno de aminoácidos libres
más péptidos.
(A) (B) (C) (D)
- Aminoácidos totales (HPLC)
(C) (D)
- Aminoácidos libres (HPLC)
(A) (C) (D)
- Aminas biógenas**
(A)
- Monosacáridos de los polisacáridos
(C) (D)
- Bioactividad
(A) (B) (C) (D)
- HPLC Analítico
(A) (C) (D)

*Vinos espumosos de la variedad Malvar y Albillo y autolisados
 **Vino tinto de la variedad Tempranillo.

2.7. Evaluación de las bioactividades de las muestras estudiadas.

2.7.1. Determinación de la actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA).

La actividad IECA se ha medido con el método de Cushman y Cheung (1971), modificado por Hernández-Ledesma y col. (2003). El método se basa en la medida espectrofotométrica a 228 nm del ácido hipúrico formado por la reacción del sustrato hipuril-histidil-leucina (HHL) con la ECA, en presencia y ausencia de inhibidor (figura 2.7-1).

Se prepara una disolución de sustrato constituida por HHL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) de concentración 10 mM disuelta en un tampón fosfato potásico 200 mM y cloruro sódico 300 mM, de pH 8,3. Se añaden 25 µL de ECA (EC 3.4.15.1, 5,1 UI/mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), correspondientes a 4 mU de ECA disueltas en glicerol al 50%, a 110 µL de la disolución de sustrato y a 15 µL de cada una de las muestras cuya actividad inhibitoria de la ECA se quiere determinar. La reacción se ha llevado a cabo durante 80 minutos a 37 °C. Posteriormente, se inactiva la enzima por descenso del pH, adicionando 110 µL de HCl 1 N. El ácido hipúrico formado durante la reacción se extrae con 1000 µL de acetato de etilo. Tras agitación y posterior centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga Biofuge pico (Heraeus, Hanau, Germany), se toman 750 µL de la fase orgánica. La eliminación del acetato de etilo se realiza por calentamiento a 95 °C durante 15 minutos. El residuo de ácido hipúrico se disuelve en 1000 µL de agua destilada y tras agitar, se mide la absorbancia a 228 nm en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA).

La actividad inhibitoria de la ECA ha sido medida por triplicado, y para determinar el porcentaje de inhibición de cada muestra se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad IECA} = \frac{[(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}) - (\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco muestra}})]}{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}} \times 100$$

$Abs_{control}$: Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA sobre el HHL, sin inhibidor.

Abs_{blanco} : Absorbancia del HHL que no ha reaccionado, en ausencia de enzima, y que ha sido extraído con el acetato de etilo.

$Abs_{muestra}$: Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA sobre el HHL, en presencia de sustancias inhibidoras.

$Abs_{blanco\ muestra}$: Absorbancia del HHL y de la muestra que no han reaccionado, en ausencia de enzima, y que han sido extraídos con el acetato de etilo.

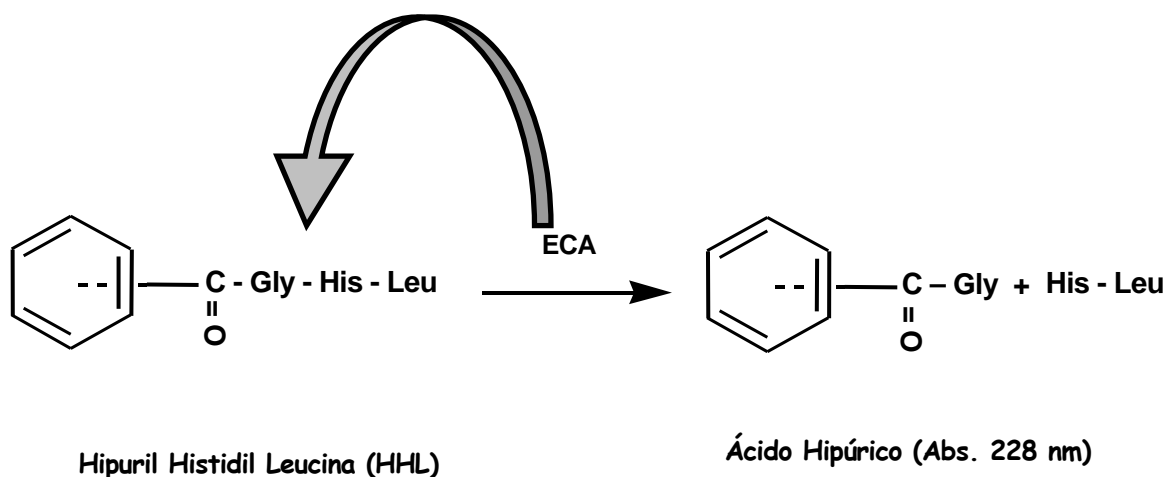


Figura 2.7-1. Reacción de hidrólisis del sustrato Hipuril-Histidil-Leucina, catalizada por la ECA.

El control se somete al mismo tratamiento que las muestras, pero se emplean 15 μL de agua en el lugar de la muestra. El blanco, también ha recibido el mismo tratamiento que el resto de las muestras, pero en lugar de añadir enzima y muestra se añaden 40 μL de agua. Por último, en los blancos de cada una de las muestras se sustituyen los 25 μL de enzima por agua y son procesados de igual forma que las anteriores.

Los resultados se han expresado en % de actividad IECA, y en actividad / mg nitrógeno peptídico por litro de vino.

2.7.2. Determinación de la actividad antioxidante.

El ensayo utilizado para la determinación de la actividad antioxidante ha sido el método ORAC-FL (Oxygen Radical Absorbance Capacity-Fluorescein) descrito por Ou y col. (2001) y modificado por Dávalos y col. (2004).

La reacción se realiza a 37 °C, disolviéndose todos los reactivos en tampón fosfato 75 mM a pH 7,4. El antioxidante utilizado ha sido el ácido [6-Hidroxi-(2,5,7,8-tetrametil)croman]-2-carboxílico (Trolox). El volumen final de reacción es de 200 µL, conteniendo Fluoresceína (120µL, 70 nM en la concentración final). La solución de antioxidante Trolox, a diferentes concentraciones (1-8 µM en la concentración final), o muestra, y de fluoresceína, se deposita en la placa multipocillo (96 pocillos, poliestireno negro, Biogen Científica S.L., España). Esta mezcla es preincubada durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se adiciona una solución de AAPH (12 mM en la concentración final). La placa es agitada antes de la primera lectura y la fluorescencia es medida cada minuto durante 80 minutos. Se prepara un blanco utilizando FL y tampón fosfato en lugar del AAPH y del antioxidante, y un control en el que se utiliza FL y AAPH, siendo en este caso el tampón fosfato utilizado como sustituyente del antioxidante. Se realiza un calibrado utilizando Trolox con 8 concentraciones diferentes (1-8 µM en la concentración final) como antioxidante. Cada una de las muestras y de los puntos de la curva de calibrado se han realizado por duplicado y se han hecho, al menos, 3 ensayos de cada una de las muestras. Se ha utilizado un equipo Fluostar Optima (BMG Labtechnologies GMBH, Offenburg, Germany) con una longitud de onda de excitación de 485 nm y de 520 nm de emisión. El equipo se ha controlado con el software Fluostar Optima 1.32 R2.

Los resultados de fluorescencia obtenidos han sido llevados del software de adquisición a una hoja de Excel para los cálculos posteriores. Las medidas obtenidas de la oxidación de la FL en función del tiempo han sido normalizadas. Para ello, el área bajo la curva (AUC) de la fluorescencia obtenida se calcula mediante la fórmula:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i / f_0$$

donde f_0 es el valor inicial de la fluorescencia a tiempo cero y f_i es el valor de la fluorescencia a tiempo i . La AUC total correspondiente a cada muestra se calcula como la diferencia entre la AUC del antioxidante (Trolox o muestra) y del blanco. A continuación se calcula la recta de regresión entre la AUC neta y la concentración del antioxidante. La pendiente de esta recta se usa para calcular el valor ORAC-FL usando los valores obtenidos por la curva del Trolox y de la muestra para cada ensayo. El valor final de ORAC-FL se ha expresado como μmol de trolox equivalente por cada mg de nitrógeno peptídico.

2.8. Cromatografía de líquidos de alta temperatura.

2.8.1. Sistema cromatográfico de cromatografía líquida de alta temperatura.

El sistema utilizado (figura 2.8-1) consiste en un HPLC 1100 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), el cual está compuesto por una bomba binaria, un degasificador de vacío en línea y un inyector automático, todo ello controlado por el software ChemStation (Agilent Technologies). La fase móvil y las muestras inyectadas se hacen circular hacia un tubo capilar de acero inoxidable (400 mm de longitud x 0,25 mm de d.i.) el cual está conectado a una columna, encontrándose ambos en el interior de un horno (Fisons Instruments 8000 series GC, Rodano, Italia). Las temperaturas que se han utilizado están comprendidas entre los 40 °C y los 208 °C, y los volúmenes de inyección han sido de 1 y 2 μL . Después de la separación cromatográfica, el eluido se enfría a temperaturas por debajo de 25 °C utilizando un tubo capilar de acero inoxidable (200 mm de longitud x 0,17 mm de d.i.) introducido en un baño de agua termostatzada. Para mantener el disolvente en estado líquido se ha utilizado un tubo restrictor (polieteretercetona (PEEK), 0,064 mm de d.i.) a la salida de la unidad de enfriamiento.

La fase móvil utilizada, a menos que se mencione otro disolvente, consistió en agua y metanol (J.T. Baker, Deventer, Países Bajos) (v/v), a pH 4, ajustado con ácido acético (J.T. Baker, Deventer, Países Bajos) en diferentes proporciones. La velocidad del flujo utilizada está comprendida dentro del intervalo de 50-300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Las columnas utilizadas han sido:

Columna comercial:

§ DiamondBond®-C₁₈ (ZirChrom, Anoka, MN, USA), 100 mm de longitud x 4,6 mm de d.i., 300 Å, 3 µm. Columna de fase inversa de carbono C₁₈ recubierta de zirconio.

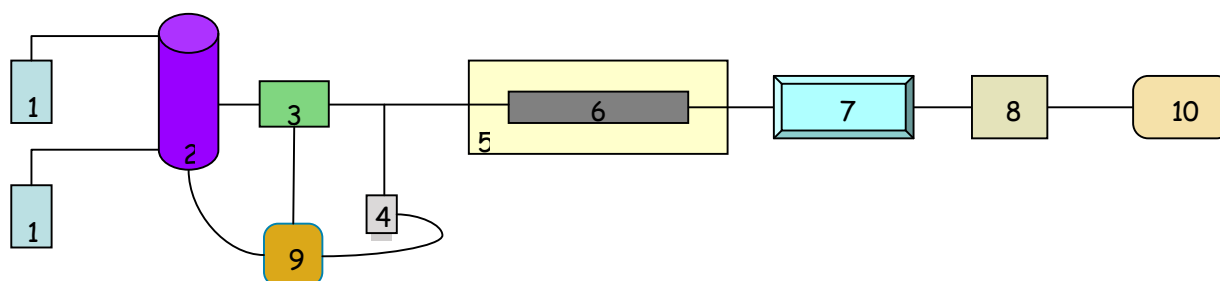
Columnas empaquetadas en el laboratorio:

§ PRP-1 (Hamilton, Bonaduz, Suiza), 90 mm de longitud x 0,8 mm de d.i., 100 Å, 5 µm. Columna de fase inversa polimérica de poliestireno-divinilbenceno.

§ Zirchrom®-PBD (ZirChrom, Anoka, MN, USA), 90 mm de longitud x 0,8 mm de d.i., 300 Å, 3 µm. Columna de fase inversa de polibutadieno con recubrimientos de zirconio.

§ Pathfinder AP (Shimadzu, Kyoto, Japón), 90 mm de longitud x 0,8 mm de d.i., 300 Å, 4 µm. Columna de fase inversa.

El control del detector, la adquisición de datos y el procesamiento de los mismos han sido realizados con el software LCMSsolution v3.10 (Shimadzu, Kyoto, Japón).



- | | | | | | |
|------------------------|-------------|------------------------|--------------------------|-------------|------------|
| 1. Fase móvil | 2. Bomba | 3. Desgasificador | 4. Inyector automático | 5. Horno GC | 6. Columna |
| 7. Módulo enfriamiento | 8. Detector | 9. Control del sistema | 10. Adquisición de datos | | |

Figura 2.8-1. Sistema cromatográfico de cromatografía líquida en alta temperatura.

2.8.2. Empaquetamiento de columnas.

El sistema utilizado para el empaquetamiento de las columnas se muestra en la figura 2.8-2. Para el empaquetamiento de las mismas se han tenido en cuenta algunas recomendaciones de los fabricantes del relleno y comprende los siguientes pasos:

✱ Acondicionamiento del relleno. Se suspenden, en función del tipo relleno, entre 100 y 300 mg de relleno en 4 mL de acetona y se agita la disolución mediante agitación magnética, para que el relleno se hidrate de forma adecuada, durante, aproximadamente, 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se ultrasonica durante 10 minutos y, una vez transcurrido este tiempo, se dejan depositar las partículas por decantación para eliminar las partículas más pequeñas y el disolvente. A continuación, se le añaden 4 mL de acetona y se vuelve a agitar hasta obtener una suspensión.

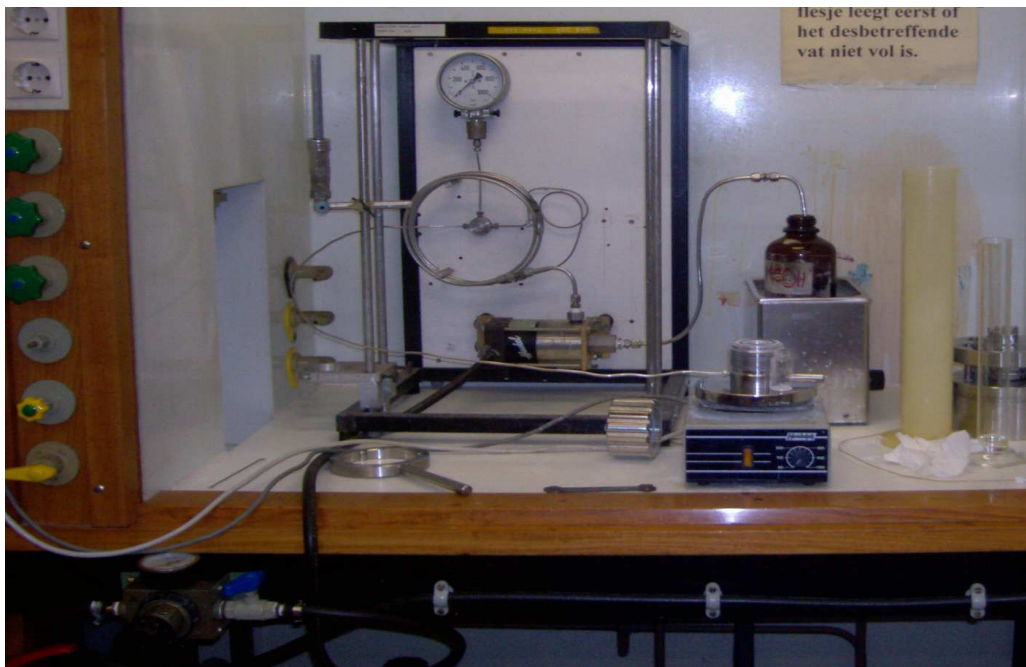


Figura 2.8-2. Sistema de empaquetamiento de columnas.

✱ Purga del sistema de empaquetamiento. Para la purga se ha utilizado acetona, colocada al inicio del sistema, que se ultrasonica, continuamente, durante todo el proceso. La acetona se impulsa a través del sistema, con una presión comprendida entre 0,1 y 0,2 MPa, utilizando aire comprimido y regulado por un manómetro. Se purga todo el sistema con la acetona hasta comprobar que no existe aire en el interior del mismo y que está limpio.

✱ Empaquetamiento. El relleno acondicionado se dispone en una cápsula, que ha sido limpiada, previamente, con acetona. La cápsula, una vez rellena con la suspensión del relleno y con un imán, se coloca sobre una placa agitadora y se cierra con un tornillo sobre el que se conecta la columna. A la salida de la columna se coloca un fritado y un capilar de drenaje.

Posteriormente se elimina el aire que pudiese haber quedado en la cápsula, pasando acetona por el sistema con una presión muy pequeña (0,1 MPa). Por último, una vez que todas las conexiones han sido cerradas, se somete al sistema a una presión de 0,2 MPa y se va incrementando dicha presión poco a poco, de manera que se alcance una presión final de 45 MPa en 10 segundos. El sistema se mantiene con esta presión durante 45 minutos, aproximadamente. Una vez finalizado el empaquetamiento, se desconecta la columna de la cápsula, colocando un fritado y un tornillo conector en la entrada de la misma.

2.8.3. Optimización del método de separación mediante HTLC.

En la optimización del método se ha utilizado el sistema descrito en el punto 2.8.1. La detección se ha llevado a cabo mediante un detector de ultravioleta HPLC 1100 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Para el estudio de la influencia de la composición de la fase móvil, la estabilidad del relleno de la columna, la temperatura de la columna y el flujo de la fase móvil sobre la separación cromatográfica, se ha separado una mezcla compuesta por benzoato de metilo, de etilo y de propilo (peso molecular, 136,2 Da, 150,2 Da, 164,2 Da, respectivamente) (Acros, Geel, Bélgica), con una concentración de 50 µM para cada uno de ellos, a diferentes temperaturas y diferentes velocidades del flujo, según el caso en estudio. La detección se ha realizado a 230 nm. Por otro lado, para estudiar la estabilidad térmica del relleno de las columnas se han separado cuatro flavonoides: Flavona (2-Fenilcromona, 222,2 Da), Formononetina (7-Hidroxi-3-(4-metoxifenil) cromona, 268,3 Da), Genisteína (4',5,7-Trihidroxisoflavona ó 5,7-Dihidroxi-3-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona, 270,2 Da) y Genistina (4',5,7-Trihidroxisoflavona-7-glucósido, 432,4 Da) (Roth, Karlsruhe, Alemania), a un flujo de 50 µL/min, realizándose la detección con un espectrómetro de masas LCMS-2010

(Shimadzu, Kyoto, Japón), equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI-MS) y se ha utilizado en modo de ionización positiva. El voltaje de la cámara de ionización, en donde se ioniza y desolvata la muestra, ha sido de -20 V a 175 °C y el del detector de 2,3 kV. El gas de nebulización ha sido nitrógeno y se ha utilizado a un flujo de 4 L/min. La temperatura de la cámara de ionización es de 200 °C.

2.8.4. Ensayo Bioquímico de la Catepsina B.

2.8.4.1. Sistema HTLC.

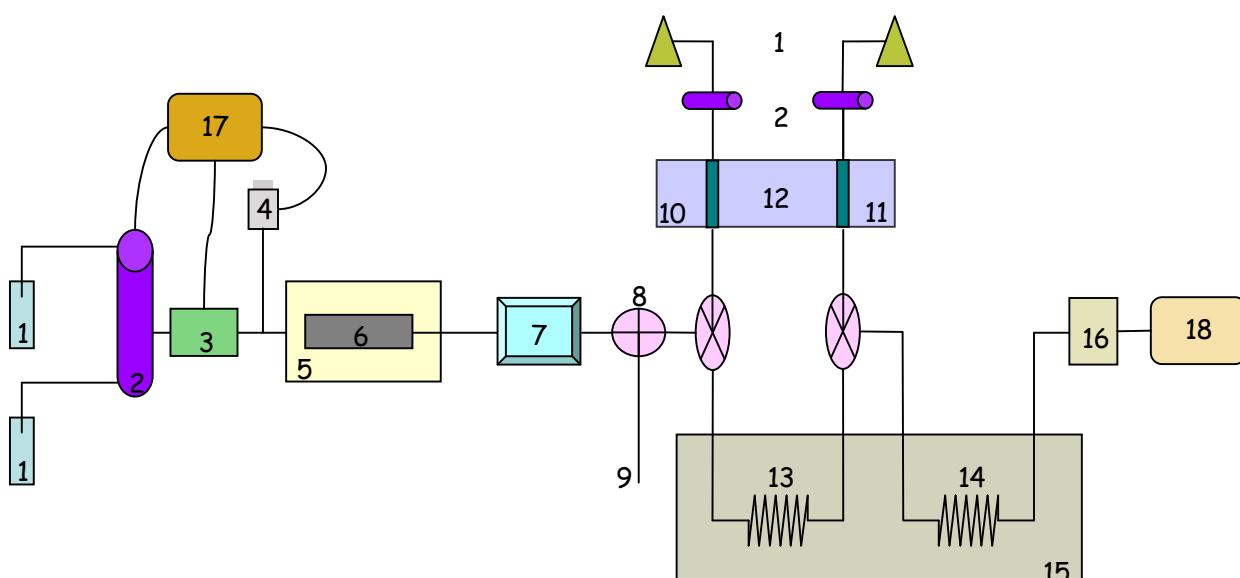
Para realizar el ensayo bioquímico se ha utilizado el equipo descrito en el punto 2.8.3., con una columna PRP-1, la cual está en el interior del horno a una temperatura que varía entre 90 y 208 °C mediante un gradiente lineal cuya velocidad varía en función del ensayo, utilizándose agua al 100% como fase móvil, llevada a pH 4 con ácido acético y una velocidad de flujo de 150 µL/min.

La detección ha sido realizada mediante un espectrómetro de masas en las mismas condiciones utilizadas en el punto anterior. Para reducir el flujo procedente del sistema de HTLC, antes del detector, se ha intercalado una válvula que permite eliminar el 75% de dicho flujo, enviando el resto hacia el ensayo biológico acoplado al ESI-MS. El control de los instrumentos, la adquisición de datos y el procesamiento de los mismos han sido realizados con el software LCMSsolution v3.10 (Shimadzu, Kyoto, Japón).

2.8.4.2. Ensayo bioquímico en línea.

El ensayo bioquímico ha sido acoplado al sistema de HTLC, entre la unidad de enfriamiento y el detector (figura 2.8-3). La enzima catepsina B (EC 3.4.22.1, de bazo bovino; actividad, 19 UI/mg de proteína, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), (concentración final 30 nM) y el sustrato Z-Phe-Arg-AMC (hidrocloruro de benziloxycarbonil-Phe-Arg-7-amino-4-metil coumarina, 649,2 Da, Bachem, Weil am Rhein, Alemania), (concentración final 50 µM), se han disuelto en una disolución acuosa de formiato amónico acuoso [20 mM, pH 7 con hidróxido amónico, (J.T. Baker, Deventer, Países Bajos)] y 50 µM de DTE (1,4-Ditioeritritol, 154,3 Da), ambos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. El DTE se utiliza como activador de la Catepsina B. Los compuestos de monitorización del sistema (SMC) [cAMP (Adenosina-3',5'-ciclodifosfato, 329,2 Da, SMC1) y biotina (244,3 Da, SMC2), ambos de Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA], (concentración final de cada uno de ellos 10 μ M), se adicionan a la solución enzimática y a la de sustrato, respectivamente. Se han utilizado tres inhibidores de la catepsina B: E-64 [trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino)-butano, 357,4 Da], CA-074 ([L-3-trans-(propilcarbamil)-oxirano-2-carbonil]-L-isoleucil-L-prolina, 383,4 Da) y Leupeptina (N-acetil-Leu-Leu-Arg-al, 426,6 Da), todos ellos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, a diferentes concentraciones, en función del ensayo.



- | | | | | |
|--------------------------|-------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|
| 1. Fases | 2. Bombas | 3. Desgasificador | 4. Inyector automático | 5. Horno GC |
| 6. Columna | 7. Módulo enfriamiento | 8. Válvula división flujo (Splitter) | 9. Desecho | 10. Superloop (Enzima) |
| 11. Superloop (Sustrato) | 12. Baño de Hielo | 13. Biorreactor A | 14. Biorreactor B | 15. Horno |
| 16. ESI-MS | 17. Control del sistema | 18. Adquisición de datos | | |

Figura 2.8-3. Sistema de cromatografía de líquidos de alta temperatura acoplado a un ensayo bioquímico

El bioensayo se ha realizado en dos biorreactores colocados en serie (figura 2.8-3, módulos 13 y 14), fabricados con un tubo de PEEK, el cual se enrolla en espiral (0,17 mm de diámetro interno, volumen del biorreactor A, 40 μ L; volumen del biorreactor B, 60 μ L) para aumentar el contacto entre la enzima y el sustrato y provocar la mezcla de forma radial. Ambos biorreactores fueron colocados en un horno de columnas, a 49 °C (Mistral, Spark Holland, Emmen, Países Bajos). Las soluciones de enzima y de sustrato se introducen a través de dos superloops (Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia) colocados en un baño de hielo, a una velocidad de flujo de 30 μ L/min, utilizando una bomba LKB 2150 (LKB, Bromma, Suecia) para cada uno de ellos. Antes del biorreactor A, la solución de enzima se mezcla con el eluido de la HTLC. En el biorreactor B, la mezcla procedente del biorreactor A es mezclada con la solución de sustrato.

2.8.5. Ensayo Bioquímico de la ECA.

2.8.5.1. Sistema HTLC.

Para la realización del ensayo bioquímico de la ECA se ha utilizado el sistema descrito en el punto 2.8.4., con modificaciones (figura 2.8-4). Las modificaciones que se realizan en el sistema consisten en derivar parte del flujo postcolumna, mediante un divisor de flujo, “splitter”, hacia el ensayo bioquímico, detectándose la inhibición de la ECA con un detector de fluorescencia HPLC 1100 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con λ_{exc} y λ_{emi} , de 320 y 420 nm, respectivamente, mientras que el resto del flujo se deriva hacia un espectrómetro de masas LCMS-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japón) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI-MS). El espectrómetro de masas se ha utilizado en las mismas condiciones que en el punto 2.8.3., obteniéndose la información estructural de los compuestos que eluyen de la columna. El control de los instrumentos, la adquisición y el procesamiento de los datos para el detector de fluorescencia y el detector de masas se ha realizado en ordenadores independientes, siendo el software ChemStation (Agilent Technologies) empleado para los datos obtenidos mediante fluorescencia y el software LCMSsolution v3.10 (Shimadzu, Kyoto, Japón) para los datos procedentes del detector de masas.

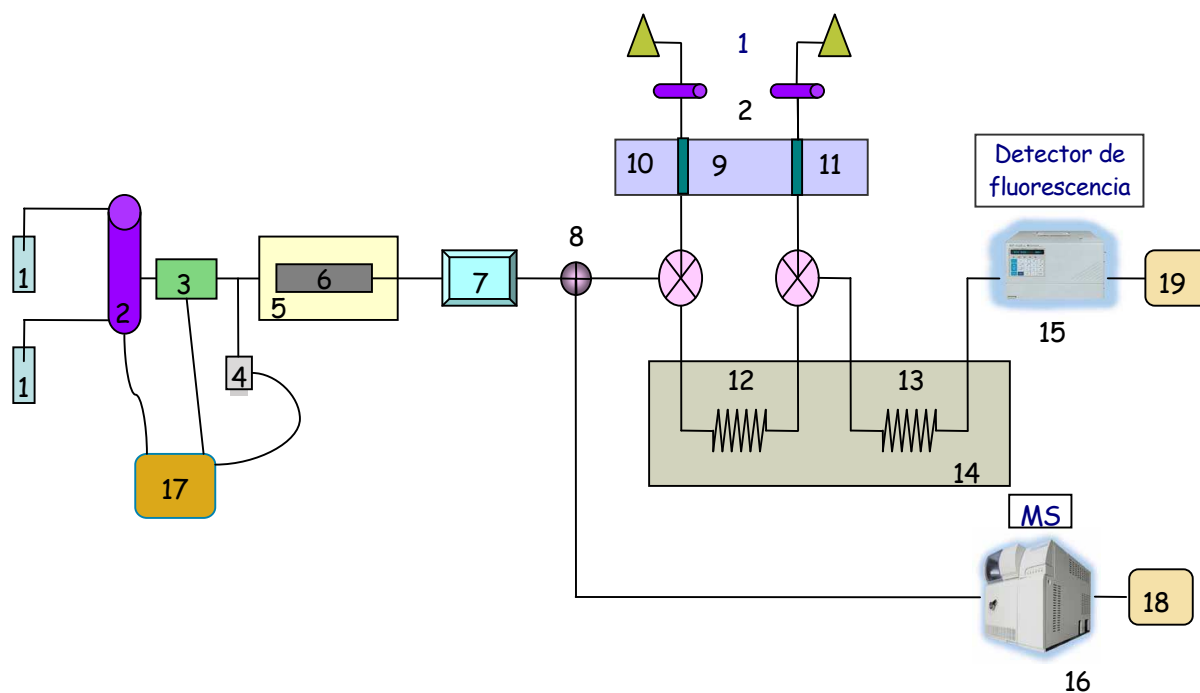
La columna que se utiliza es la PRP-1, la cual se encuentra en el interior de un horno (Fisons Instruments 8000 series GC, Rodano, Italia) a una temperatura de 140 °C, utilizando para la reacción enzimática una temperatura de 49 °C. La fase móvil utilizada es del 100% de agua,

llevada a pH 4 con ácido acético y una velocidad del flujo de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, de los cuales 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ fueron derivados hacia el MS.

2.8.5.2. Ensayo bioquímico en línea.

El ensayo bioquímico se ha acoplado al sistema de HTLC, entre la unidad de enfriamiento y el detector de fluorescencia. La enzima convertidora de angiotensina (EC 3.4.15.1, de pulmón de conejo, actividad, 4,7 UI/mg de proteína).Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), (0,02 U/mL) y el sustrato, Abz-Gly-(p-nitro)-Phe-Pro-OH (o-aminobenzoilglicil-p-nitro-fenil-prolina, 483,48 Da, Bachem, Weil am Rhein, Alemania) (250 μM), son disueltos en una disolución constituida por 200 mM de Tris, 0,5% de Tween 20 (ambos de Merck, Amsterdam, Países Bajos) y 300 mM de NaCl (J.T. Baker, Deventer, Países Bajos), todo ello llevado a pH 7,5. Los SMCs (cAMP y biotina, concentración final de cada uno de ellos 10 μM), son adicionados a la solución enzimática y a la de sustrato, respectivamente. Se ha utilizado como inhibidor de la ECA al captopril (N-[(S)-3-mercaptopropano-2-metilpropionil]-L-prolina, 217,29 Da, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a diferentes concentraciones (100 nM-70 μM).

El bioensayo se ha realizado en dos biorreactores en serie, fabricados con un tubo de PEEK, el cual se enrolla en espiral (0,17 mm de diámetro interno, volumen del biorreactor A, 70 μL ; volumen del biorreactor B, 180 μL) para aumentar el contacto entre enzima y sustrato. El volumen de estos biorreactores fue optimizado para que el tiempo de incubación en cada uno de ellos fuese el adecuado. Ambos biorreactores se colocan en un horno de columnas (Mistral, Spark Holland, Emmen, Países Bajos), a una temperatura que fue optimizada después de varios ensayos a 49 °C. Las soluciones de enzima y de sustrato son introducidas a través de dos superloops (Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia) colocados en un baño de hielo, a una velocidad de flujo de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, utilizando una bomba LKB 2150 (LKB, Bromma, Suecia) para cada uno de ellos. Antes del biorreactor A, la solución de enzima se mezcla con el eluido de la HTLC. En el biorreactor B, la mezcla procedente del biorreactor A se mezcla con la solución de sustrato.



- | | | |
|--|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1. Fases | 2. Bombas | 3. Desgasificador |
| 4. Inyector automático | 5. Horno GC | 6. Columna |
| 7. Módulo enfriamiento | 8. Válvula división flujo (Splitter) | 9. Baño de Hielo |
| 10. Superloop (Enzima) | 11. Superloop (Sustrato) | 12. Biorreactor A |
| 13. Biorreactor B | 14. Horno | 15. Detector fluorescencia |
| 16. Detector ESI-MS | 17. Control del sistema | 18. Adquisición de datos MS |
| 19. Adquisición de datos fluorescencia | | |

Figura. 2.8-4. Sistema de cromatografía de líquidos de alta temperatura acoplado a un ensayo bioquímico.

2.8.6. Ensayo de bioactividad en un autolisado de levadura vínica mediante HTLC-MS modificado.

2.8.6.1. Preparación de autolisado de levadura.

Se ha seguido la metodología utilizada en el punto 2.1.4

2.8.6.2. Detección en línea.

El sistema optimizado en el punto 2.8.5., se ha aplicado a un autolisado de levadura para corroborar su utilidad. En este caso, a diferencia del sistema del punto 2.8.5., se utiliza un gradiente de temperatura de la columna, el cual se inicia en 40 °C y se mantiene durante 5 minutos, llegando hasta los 140 °C con un gradiente de 20 °C/min. El volumen de inyección ha sido de 5 µL a una velocidad del flujo del sistema HTLC de 150 µL/min, siendo la velocidad del flujo de la enzima y sustrato de 20 µL/min. La columna utilizada fue la PRP-1.

Resultados

5. RESULTADOS.

5.1. La fracción nitrogenada de vinos tintos envejecidos con y sin lías.

5.1.1. Influencia de la fermentación maloláctica, de los tratamientos postfermentativos y del envejecimiento con y sin lías, sobre los compuestos nitrogenados de vinos tintos.

Como hemos recogido en la introducción, se están introduciendo en las bodegas distintas prácticas enológicas dirigidas a obtener vinos más complejos desde el punto de vista sensorial y, a su vez, diferentes de otros vinos existentes en el mercado. Entre ellas, se encuentra la realización de la fermentación maloláctica de los vinos tintos en la bodega en la que se va a realizar el envejecimiento y el envejecimiento con las lías de las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Esta tecnología no está exenta de riesgos por la posible formación de compuestos indeseables como las aminas biógenas y la aparición de péptidos que pueden dar lugar a sabores desagradables en los vinos. Ante la ausencia de estudios sobre la influencia de estos métodos de producción en la composición en aminoácidos y la formación de aminas biógenas en los vinos y al no existir ningún estudio sobre la fracción peptídica de los vinos tintos, se ha planteado este estudio. Para ello, partiendo de un único vino de la variedad Tempranillo, elaborado en una bodega de Navarra, se han obtenido nueve lotes de vinos. La fermentación maloláctica se ha realizado en depósito o en bodega y el envejecimiento con o sin lías, que han sido removidas semanal o mensualmente o no han sido removidas. Los detalles de la elaboración de estos vinos así como las claves utilizadas para cada una de las muestras, se recogen en el apartado 2.1.1. de materiales y métodos.

3.1.1.1. Variación del nitrógeno total, de los aminoácidos libres y de las aminas biógenas durante la fermentación maloláctica e influencia de los tratamientos de clarificación y estabilización.

Se ha realizado el análisis de la composición en nitrógeno total, en aminoácidos libres y en aminas biógenas en las muestras mencionadas en el apartado anterior, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.1-1. Como puede observarse, antes de la FML, el vino inicial presenta un relativo bajo contenido en nitrógeno total, 226,8 mg/L, el cual es más pequeño que el valor medio, 306,0 mg/L, descrito por Cáceres y col. (1987) en un estudio realizado con 45 vinos tintos españoles de diferentes orígenes geográficos. Durante la FML, el contenido en nitrógeno

total disminuye, llegando a ser, prácticamente, igual en el vino que ha realizado la FML en barrica (192,1 mg/L) y el vino que ha realizado la FML en depósito de acero (197,7 mg/L). En las muestras de vino después de los procesos de trasiego, clarificación y estabilización (vinos D-SL-T, D-SL-C y D-SL-E), se produce un aumento en el contenido de nitrógeno total, respecto al vino cuya FML se realiza tanto en depósito de acero (FML-D) como en barrica (FML-B), debido, probablemente, a la liberación de nitrógeno por parte de los microorganismos después de que la FML haya finalizado y antes de que se produzcan los diferentes procesos de trasiego, clarificación y estabilización.

En la tabla 3.1-1 también se muestra el contenido en aminoácidos libres, determinado mediante HPLC, de estos vinos. La concentración total en el vino inicial, 183,0 mg/L, también es menor que el valor medio de la concentración encontrada en la bibliografía (Cáceres y col., 1986) en vinos tintos españoles. Los aminoácidos mayoritarios, en el vino inicial, son ácido glutámico, asparagina, glicina, arginina, α -alanina y fenilalanina que están presentes en concentraciones comprendidas entre 10 y 20 mg/L. A continuación, en concentraciones entre 9 y 10 mg/L, se encuentran los aminoácidos ácido aspártico, tirosina, triptófano, leucina y lisina. El resto de los aminoácidos detectados se encuentran en concentraciones menores de 9 mg/L. No se han detectado diferencias importantes en la concentración de aminoácidos libres entre las muestras que han realizado la FML en barrica (187,4 mg/L) y la del vino inicial, siendo, aproximadamente, del mismo orden, mientras que el contenido de los aminoácidos libres en el vino que realiza la FML en depósito de acero es un poco más bajo (172,6 mg/L) (tabla 3.1-1). Esta pequeña disminución que se produce con respecto al vino inicial se debe a que los aminoácidos son utilizados por las bacterias como nutrientes.

La diferencia en la suma de los aminoácidos libres, después de la FML respecto al vino inicial, no es equivalente a la disminución observada en el contenido de nitrógeno total. Esta circunstancia, sugiere que, probablemente, se produce la liberación de aminoácidos procedentes de las proteínas o péptidos del vino, debido a la acción de las proteasas de las bacterias lácticas, lo que es corroborado por el hecho de que, a pesar de presentar el vino inicial un contenido total de aminoácidos libres relativamente similar, la mayoría de estos aminoácidos libres muestren un aumento en su concentración en los vinos que han realizado la FML, respecto al vino inicial. La actividad proteásica exocelular de las bacterias lácticas ha sido descrita en soluciones modelo (Manca de Nadra y col., 1999; Manca de Nadra y col., 1997) y ocurre, principalmente, en medios pobres en nitrógeno (Remize y col., 2006), tal y como sucede en el vino inicial usado en este estudio. Simultáneamente, los aminoácidos libres se han debido transformar en otra serie de

compuestos, como, por ejemplo, compuestos responsables del aroma, lo cual justifica la disminución observada de nitrógeno total.

Tabla 3.1-1. Contenido en nitrógeno total, aminoácidos libres y aminos biógenas (mg/L) en el vino inicial y en vinos después de la FML y de los distintos tratamientos.

	Vino Inicial	FML en Depósito de acero				FML en Barrica
		FML-D	D-SL-T	D-SL-C	D-SL-E	FML-B
Nitrógeno total	226,8	197,7	220,0	218,0	216,0	192,1
Aminoácidos libres						
Asp	9,7	10,3	16,9	14,4	15,4	10,9
Glu	19,4	17,6	18,0	14,1	18,7	19,7
Asn	10,2	11,0	12,3	9,6	16,4	11,5
Ser	7,0	7,7	6,3	8,7	4,8	8,1
Gln	7,0	8,0	5,0	5,0	6,0	7,0
His	7,5	7,9	5,3	n.d.	n.d.	7,5
Gly	10,9	10,0	5,9	9,8	7,7	8,6
Thr	7,9	8,4	6,4	8,9	5,4	10,0
Arg	14,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Ala	n.d.	n.d.	1,0	4,0	1,0	n.d.
α-Ala	14,5	14,6	14,6	18,2	18,7	17,1
Gaba	8,1	9,2	9,4	7,0	6,6	8,9
Tyr	9,3	n.d.	n.d.	n.d.	1,5	9,9
Met	5,6	5,0	4,6	3,6	6,6	5,6
Val	6,9	7,4	8,7	2,7	6,2	8,2
Trp	9,1	9,6	6,8	6,4	2,7	9,5
Phe	10,1	10,9	11,3	9,9	10,8	11,3
Ile	6,2	6,1	5,2	5,9	2,2	7,0
Leu	9,5	10,3	13,8	10,5	10,0	11,1
Orn	n.d.	8,0	7,0	7,0	9,0	3,0
Lys	9,7	10,6	10,2	10,4	10,4	12,5
Suma de aminoácidos libres	183,0	172,6	168,7	156,1	160,1	187,4
Aminas biógenas						
Histamina	1,0	1,8	3,6	3,4	2,8	1,9
Metilamina	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,7
Etilamina	0,8	0,8	0,8	0,8	1,2	0,8
Tiramina	1,7	2,0	3,7	3,6	5,4	2,1
2-Feniletilamina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Putrescina	2,3	4,1	5,9	5,9	5,9	4,1
Cadaverina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Suma de aminos biógenas	6,6	9,5	14,8	14,5	16,2	9,6

n.d.= no detectado; Gaba: ácido γ-aminobutírico

En el vino inicial se observa la ausencia de ornitina, la cual está presente en muchos de los vinos tintos estudiados por diferentes autores (Etievant y col., 1988; Marcobal y col., 2006; Pozo-Bayón y col., 2005). El resultado más relevante es la desaparición de arginina dando lugar a ornitina en los vinos después de la FML. Este resultado sugiere que la cepa de bacteria responsable de la FML puede degradar la arginina y formar ornitina por la vía de la arginina desiminasa (ADI), como se describe para otras bacterias heterofermentativas (Liu y col., 1994; Manca de Nadra y col., 1986a; Manca de Nadra y col., 1986b). La arginina es un aminoácido esencial para *Oenococcus oeni*, bacteria responsable mayoritariamente de la FML y que muestra actividad, cepa-dependiente, de las tres enzimas responsables de la vía ADI, degradando la arginina como fuente de energía (Mangani y col., 2005; Fourcassie y col., 1992).

Otro aspecto a destacar es que ni la fenilalanina ni la lisina, aminoácidos precursores de la 2-feniletilamina y de la cadaverina, respectivamente, disminuyen durante la FML, sino que permanecen, prácticamente, en las mismas concentraciones en todas las muestras, e incluso aumentan en alguna de ellas. La tirosina desaparece completamente durante la FML en depósito. Este aminoácido es esencial para *Oenococcus oeni* según Garvic (1967), aunque Fourcassie y col. (1992) no lo consideran esencial para las cepas estudiada por ellos.

En cuanto al contenido en aminas biógenas, cabe destacar que no se ha detectado la presencia de las aminas 2-feniletilamina y cadaverina en ninguna de las muestras estudiadas, dato corroborado por el hecho de que ni la fenilalanina ni la lisina disminuyen durante la FML, como se ha comentado anteriormente. Con relación a los valores de aminas biógenas encontrados en la bibliografía para vinos tintos antes de la FML, (Marcobal y col., 2006; Soufleros y col., 1998; Landette y col., 2005) el vino inicial estudiado presenta un contenido menor en todas las aminas biógenas analizadas (tabla 3.1-1). Durante la FML, la concentración de histamina, tiramina y putrescina se incrementa ligeramente en 0,9, 0,4 y 1,8 mg/L, respectivamente, en los vinos que han realizado la FML en barrica y en 0,8, 0,3 y 1,8 mg/L en los vinos que han realizado la FML en depósito, mientras que la etilamina y la metilamina permanecen constantes en ambos casos.

3.1.1.2. Variación del nitrógeno total, de los aminoácidos libres y de las aminas biógenas durante el envejecimiento en barrica con o sin lías.

El proceso de envejecimiento de los vinos, una vez acabada la FML, se ha realizado en barricas bajo diferentes condiciones (apartado 2.2.1. de materiales y métodos). Se tomaron muestras de cada uno de los vinos a los 3, 6, 9, 12 y 14 meses de envejecimiento.

Los valores individuales de nitrógeno total, aminoácidos libres y aminas biógenas del vino después de la fermentación maloláctica (vinos FML-B y FML-D) y del envejecimiento en barrica con lías, sin agitación (A_0) y con agitación semanal (A_s) o mensual (A_m), (vinos B-L- $A_0/A_s/A_m$ y D-L- $A_0/A_s/A_m$) se muestran en las tablas 3.1-1A y 3.1-2A del anexo, respectivamente. En la tabla 3.1-3A del anexo se expresan los resultados, de estos análisis, de los vinos que realizaron la FML en depósito de acero y a continuación fueron envejecidos, en barricas, en ausencia de lías (vinos D-SL-T, D-SL-C, D-SL-E).

Para determinar si existe algún agrupamiento de los vinos en base a los datos de nitrógeno total, aminoácidos libres y aminas biógenas, se ha realizado el análisis de conglomerados. En la figura 3.1-1 se muestra el dendrograma obtenido usando estos datos. La distancia euclídea al cuadrado se ha usado como medida de semejanza entre las muestras, a partir de las variables estandarizadas, utilizándose el método de Ward para la unión de los grupos. Se han obtenido dos grupos principales, en uno de ellos se encuentran la mayoría de los vinos envejecidos durante 12 meses, mientras que la mayoría de los vinos envejecidos durante 3, 6 y 14 meses se encuentran en el otro grupo. Este segundo grupo se encuentra, a su vez, dividido en dos subgrupos. Uno de ellos está compuesto, principalmente, por la mayoría de los vinos que han envejecido durante 14 meses y por un mayor porcentaje de los vinos envejecidos después de los procesos de trasiego, clarificación y estabilización tartárica (D-SL-T, D-SL-C y D-SL-E), mientras que el otro subgrupo engloba a la mayoría de los vinos con pocos meses de envejecimiento (3 y 6 meses). Los vinos de 9 meses de envejecimiento están incluidos en los tres grupos. No se observa ningún agrupamiento debido a los procesos de envejecimiento de los vinos, con o sin agitación.

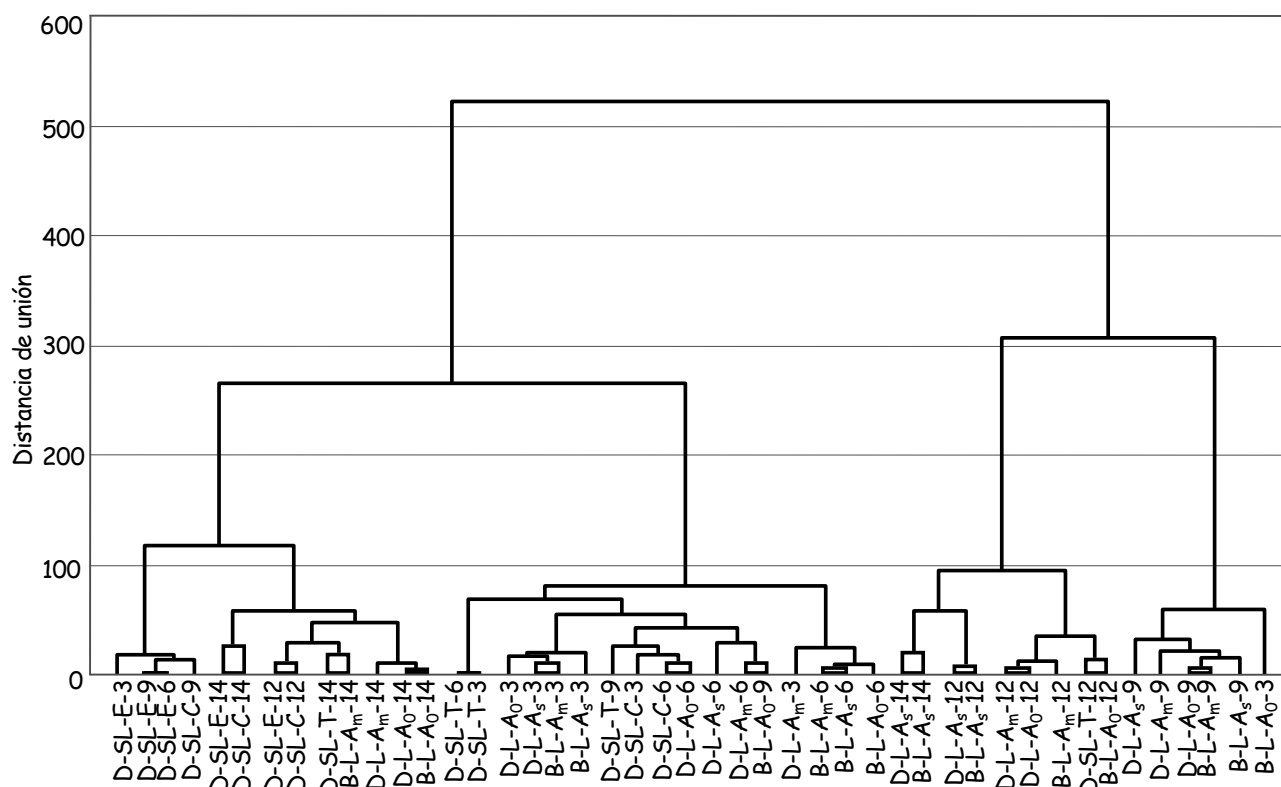


Figura 3.1-1. Dendrograma de las muestras de vino tinto estudiadas, en función de los datos de nitrógeno total, aminoácidos libres y aminas biógenas.

Con el fin de comprobar que variables ponen de manifiesto la relación entre los compuestos nitrogenados analizados en los vinos, se ha aplicado el análisis de componentes principales (CP). Las dos primeras componentes principales explican el 47,4% de la varianza total de los datos. La primera componente principal, explica el 28,3% de la varianza total y está fuertemente correlacionada con la treonina (-0,88), leucina (-0,88), glicina (-0,86), fenilalanina (-0,86) y valina (-0,76). La segunda componente principal, explica el 19,4% de la varianza total, y se correlaciona, principalmente, con ornitina (0,84), triptófano (0,78), asparagina (0,75) y tirosina (0,75). La figura 3.1-2 muestra los vinos en el plano definido por las dos primeras componentes principales. Se puede observar que la zona inferior izquierda del plano presenta valores más bajos de la CP1, y en ella están los vinos envejecidos con lías durante 12 meses, presentando los niveles más altos de los aminoácidos treonina, leucina, glicina, fenilalanina y valina. Los vinos envejecidos durante 12 y 14 meses sin lías (vinos D-SL-T, D-SL-C y D-SL-E), se sitúan a la derecha de la zona inferior del plano, lo que quiere decir que estos vinos presentan los valores

más bajos de los aminoácidos relacionados con la CP1, citados anteriormente. En relación con la segunda componente principal, los vinos envejecidos durante 12 y 14 meses presentan valores inferiores a aquellos con otros tiempos de envejecimiento, y por tanto, con menor concentración de ornitina, triptófano, asparagina y tirosina. En general, se observa que los vinos que envejecen con lías y son sometidos a agitación semanal (vinos D-L-A_s y B-L-A_s) tienen valores muy similares de los aminoácidos relacionados con las dos componentes principales, con independencia del tiempo de envejecimiento. También puede observarse similitud entre los vinos trasegados y clarificados (vino D-SL-C) y los trasegados, clarificados y estabilizados (vino D-SL-E) y entre los vinos envejecidos con lías y sin agitación que han realizado la FML en depósito (vino D-L-A₀) y los envejecidos con lías y agitación mensual (vinos D-L-A_m y B-L-A_m).

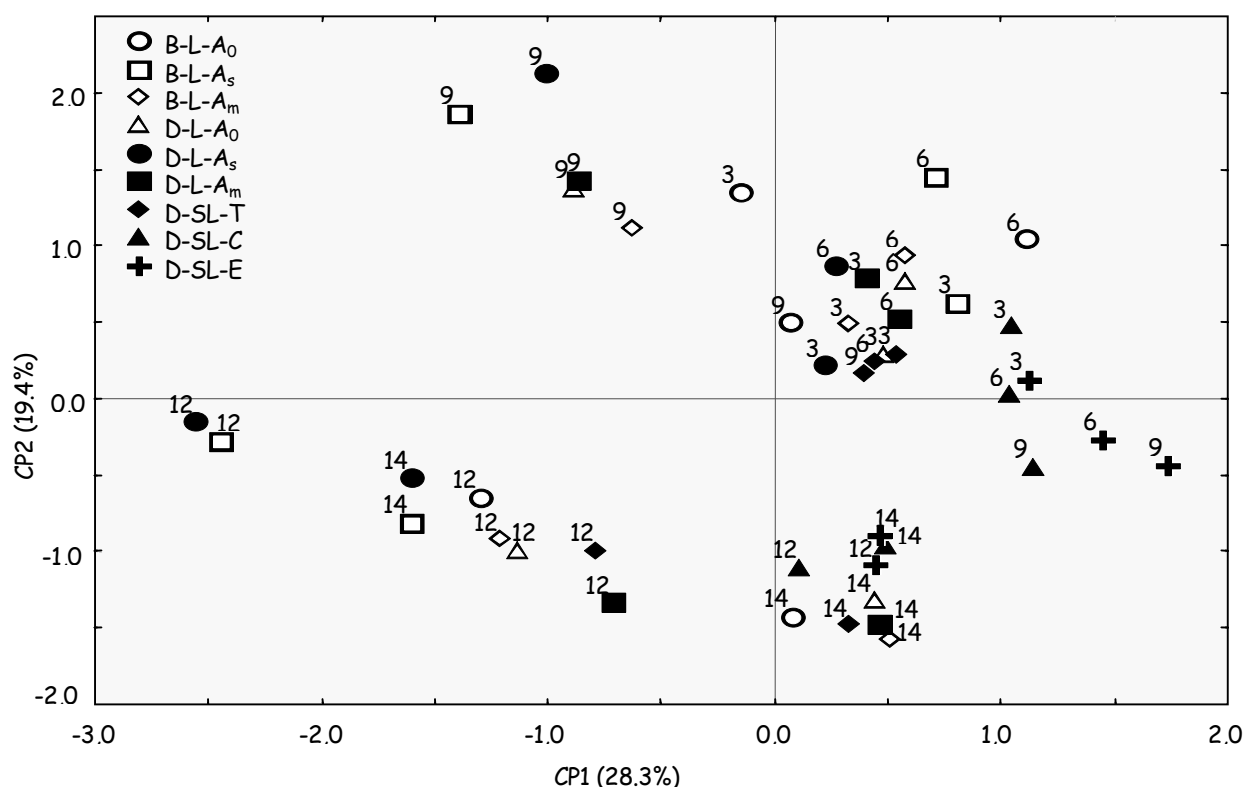


Figura 3.1-2. Representación de las muestras de vinos en el plano definido por las dos primeras componentes principales.

Para comprobar los efectos producidos por los diferentes procesos de elaboración del vino y los diferentes tiempos de envejecimiento sobre la composición nitrogenada de éstos, se ha

realizado el análisis de la varianza de dos vías. Este análisis se ha aplicado a los datos del nitrógeno total, aminoácidos libres y aminos biógenas de los vinos envejecidos desde los 3 hasta los 14 meses y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.1-2. Como se puede ver, existen diferencias significativas, debidas al método de elaboración (procesos tecnológicos), en la concentración de los aminoácidos serina, glicina, treonina, α -alanina, fenilalanina, leucina, lisina y en la suma de los aminoácidos libres, con un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$) y en todos los aminoácidos libres, excepto el ácido aspártico, respecto al tiempo de envejecimiento, con un nivel de significación del 99% ($p < 0,01$), en la mayoría de los aminoácidos libres. El test de Scheffe se ha usado para comparar las medias de aquellos valores que han resultado significativamente diferentes, y los resultados encontrados, también se resumen en la tabla 3.1-2. En general, se puede decir que los vinos que presentan la media más alta en los valores de los aminoácidos libres, con relación a las técnicas de elaboración, son aquellos vinos envejecidos con lías y con agitación semanal (vinos D-L-A_s y B-L-A_s). Aquellos con los valores más bajos de estos aminoácidos corresponden a los vinos trasegados y clarificados (vino D-SL-C) y los trasegados, clarificados y estabilizados (vino D-SL-E). En relación con el tiempo de envejecimiento, los valores medios más bajos corresponden a todos los vinos envejecidos 14 meses y a una mayor proporción de los vinos envejecidos durante 3 y 6 meses, y los valores más altos los presentan la mayoría de los vinos que envejecen durante 9 y 12 meses.

Tabla 3.1-2. Efectos de los factores, media \pm desviación Standard (SD) e intervalo de concentración de los compuestos nitrogenados (mg/L) de los vinos durante el envejecimiento (3-14 meses). Se indican, también, la muestra con los valores mayores y menores de estos compuestos en función de los procesos de elaboración y del tiempo de envejecimiento.

	Efectos de los factores		Media \pm SD	Intervalo	Procedimiento Tecnológico		Tiempo de envejecimiento	
	Proc. tecnológicos	Tiempo envejecimiento			Valores mayores	Valores menores	Valores mayores	Valores menores
Nitrógeno total	n.s.	**	215,8 \pm 16,0	180,9-238,8	--	--	6m; 9m	3m; 14m
Aminoácidos								
Asp	n.s.	n.s.	13,4 \pm 2,4	8,8-17,1	--	--	--	--
Glu	n.s.	**	25,2 \pm 3,7	19,6-32,1	--	--	6m	9m; 14m
Asn	n.s.	**	9,4 \pm 3,9	4,0-15,4	--	--	3m; 6m; 9m	12m; 14m
Ser	*	**	7,4 \pm 1,7	4,2-10,8	B-L-A _s ; D-L-A _s	D-SL-C; D-SL-E	3m; 9m	14m
Gln	n.s.	**	1,0 \pm 1,2	0,0-3,0	--	--	3m; 6m	12m; 14m
His	n.s.	*	0,7 \pm 1,1	0,0-3,5	--	--	6m; 12m	9m; 14m
Gly	*	*	10,2 \pm 2,3	0,0-16,9	B-L-A _m	D-SL-E	12m	3m; 6m; 14m
Thr	*	*	9,1 \pm 2,6	6,4-15,9	B-L-A _s ; D-L-A _s	D-SL-C; D-SL-E	12m	3m; 6m
Arg	--	--	n.d.	n.d.	--	--	--	--
β -Ala	n.s.	**	1,0 \pm 1,1	0,0-4,0	--	--	3m; 6m; 9m	12m; 14m
α -Ala	*	**	22,2 \pm 3,0	15,4-28,1	B-L-A _s ; D-L-A _s	D-SL-T; D-SL-C; D-SL-E	12m	3m
Gaba	n.s.	**	7,2 \pm 0,9	5,3-9,0	--	--	12m	6m
Tyr	n.s.	**	1,9 \pm 3,0	0,0-9,5	--	--	9m	12m; 14m
Met	n.s.	**	2,9 \pm 1,9	0,3-7,4	--	--	9m	12m
Val	n.s.	**	7,1 \pm 1,4	5,3-9,9	--	--	12m	3m; 6m; 9m; 14m
Trp	n.s.	**	5,3 \pm 1,8	3,5-9,7	--	--	9m	6m; 12m; 14m
Phe	*	**	10,7 \pm 1,8	7,0-14,6	D-L-A _s	D-SL-E	12m	6m
Ile	n.s.	**	5,1 \pm 1,3	2,2-7,4	--	--	9m; 12m	3m; 6m
Leu	*	**	11,2 \pm 2,0	8,3-16,8	B-L-A _s ; D-L-A _s	D-SL-C; D-SL-E	12m	3m; 6m; 9m
Orn	n.s.	**	3,2 \pm 3,2	0,0-9,0	--	--	3m; 6m; 9m	12m; 14m
Lys	*	**	13,9 \pm 3,1	9,2-21,5	B-L-A _s ; D-L-A _s	D-SL-T; D-SL-C; D-SL-E	9m; 12m	14m
Suma de aminoácidos	*	**	168,3 \pm 20,1	131,7-208,8	B-L-A _s ; D-L-A _s	D-SL-C; D-SL-E	9m; 12m	14m

Diferencias significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s. (no existen diferencias significativas); n.d.= no detectado; Gaba: ácido γ -aminobutírico.

Tabla 3.1-2. Continuación.

	Efectos Factores		Media \pm SD	Intervalo	Procedimientos Tecnológicos		Tiempo envejecimiento	
	Proc. tecnológicos	Tiempo envejecimiento			Valores mayores	Valores menores	Valores mayores	Valores menores
Aminas biógenas								
Histamina	**	n.s.	3,0 \pm 0,8	1,9-4,9	D-L-A _s ; D-L-A _m	B-L-A _m ; D-SL-T; D-SL-E	--	--
Metilamina	n.s.	n.s.	1,0 \pm 0,3	0,0-0,3	--	--	--	--
Etilamina	n.s.	n.s.	3,9 \pm 2,2	0,8-7,6	--	--	--	--
Tiramina	**	n.s.	3,8 \pm 0,8	2,3-5,3	D-SL-T	B-L-A ₀ ; B-L-A _s	--	--
2-Feniletilamina	--	--	n.d.	n.d.	--	--	--	--
Putrescina	**	**	6,5 \pm 1,0	4,8-9,0	D-L-A ₀ ; D-L-A _s ; D-L-A _m	D-SL-E	12m; 14m	3m
Cadaverina	--	--	n.d.	n.d.	--	--	--	--

Diferencias significativas: * p<0,05;** p<0,01; n.s. (no existen diferencias significativas); n.d.= no detectado.

En la figura 3.1-3 se representa la evolución de los aminoácidos, en función del tiempo de envejecimiento, de aquellas muestras que presentan los valores significativamente diferentes según el test de Scheffe (serina, glicina, treonina, α -alanina, fenilalanina, leucina, lisina y la suma de los aminoácidos libres), según las diferentes técnicas de elaboración de cada vino. En la figura se observa, en la mayoría de los casos, un aumento de la concentración de estos aminoácidos y de la suma de todos los aminoácidos libres entre los 6 y los 12 meses de envejecimiento en aquellos vinos que envejecen con lías. Sin embargo, este incremento no se observa en los vinos que envejecen sin lías. Este resultado indica que se ha producido una liberación de aminoácidos al vino por la autólisis, como se ha comprobado previamente en experimentos de autólisis de levaduras en medios modelo (Martínez-Rodríguez y col., 2001b; Perrot y col., 2002), en vinos espumosos envejecidos con levaduras (Moreno-Arribas y col., 1998a) y en vinos envejecidos con levaduras de flor (Charpentier y col., 2004), aunque también puede ser debido a la actividad proteásica de las bacterias, como se ha mencionado anteriormente. En la figura se aprecia, especialmente, el incremento del aminoácido treonina durante el envejecimiento. Los aminoácidos treonina y serina forman parte de las uniones O-glicosídicas de las manoproteínas de las levaduras, por lo que el incremento de este aminoácido podría confirmar la existencia de autólisis y ruptura de la pared de las levaduras. Entre los 12 y 14 meses se produce una disminución de la mayoría de los aminoácidos. Este hecho, también ha sido observado en el envejecimiento de vinos espumosos y ha sido atribuido a reacciones de descarboxilación de los aminoácidos o de formación de ésteres (Martínez-Rodríguez y col., 2002).

Existen diferencias significativas en el contenido de las aminas histamina, tiramina y putrescina referidas a los procesos de elaboración de los vinos, mientras que solo se dan diferencias significativas en la putrescina en función del tiempo de envejecimiento (tabla 3.1-2). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por (Martín-Álvarez y col., 2006). Aplicando el test de Scheffe para comparar el valor medio de las aminas, se ha encontrado que los valores medios más altos para la histamina se da en los vinos que han realizado la FML en depósito de acero, que han envejecido con lías y que han sido agitados semanal o mensualmente (vinos D-L-A_s y D-L-A_m). Los vinos con los valores medios más bajos de histamina son aquellos que han realizado la FML en barrica, han sido agitados mensualmente y envejecidos con lías (vino B-L-A_m) y los envejecidos sin lías y que han sido trasegados (vino D-SL-T) y trasegados, clarificados y estabilizados (vino D-SL-E) antes del envejecimiento.

En la figura 3.1-4 se muestra la evolución de las aminas biógenas que presentan los valores, con relación a los procesos de elaboración de los vinos, significativamente diferentes al

aplicar el test de Scheffe (putrescina, histamina y tiramina). Se observa que el contenido en histamina no cambia sustancialmente durante el envejecimiento. El valor medio de la tiramina (3,8 mg/L) es similar a los determinados en vinos españoles por Bover-Cid y col. (2005) y Marcobal y col. (2005). Se puede ver que esta amina presenta una concentración media, en los vinos fermentados en bodega, menor que en aquellos vinos fermentados en depósito, trasegados y envejecido sin lías (vino D-SL-T). Estos últimos, presentan una disminución en el contenido de tiramina durante el envejecimiento, advirtiéndose a los 14 meses concentraciones similares de esta amina en estos vinos y en los vinos fermentados en bodega. La disminución en la concentración de tiramina puede deberse a la presencia de oxidasas. En algunos estudios, se ha encontrado la presencia de la tiramina oxidasa en bebidas fermentadas y también en vinos, lo cual previene la acumulación de esta amina (Enes Dapkevicius y col., 2000).

La putrescina es la amina mayoritaria en todos los vinos, presentando un intervalo de valores desde 4,8 hasta 9,0 mg/L, con un valor medio de 6,5 mg/L. El contenido de esta amina en los vinos envejecidos con lías se incrementa durante el envejecimiento, y permanece estable en los vinos envejecidos sin lías. Jiménez Moreno y col. (2003); González Marco y Ancín Azpilicueta (2006) tampoco observaron una disminución de la concentración de putrescina durante el envejecimiento en los vinos que estudiaron. Por tanto, parece que no hay oxidación de esta amina por las oxidasas presentes en el vino. Todos los valores encontrados para esta amina fueron más bajos que los valores mínimos aportados por (Soufleros y col., 1998) en un estudio realizado con vinos franceses, y menores que el valor medio dado por (Herbert y col., 2005), de 15 mg/L.

Las aminas metil- y etilamina, con valores medios de 1,0 y 3,9 mg/L, respectivamente, no presentaron cambios significativos durante el envejecimiento en bodega y tampoco se vieron influenciadas por el proceso de elaboración seguido. Por otro lado, las aminas cadaverina y 2-feniletilamina no fueron detectadas en ninguno de los vinos.

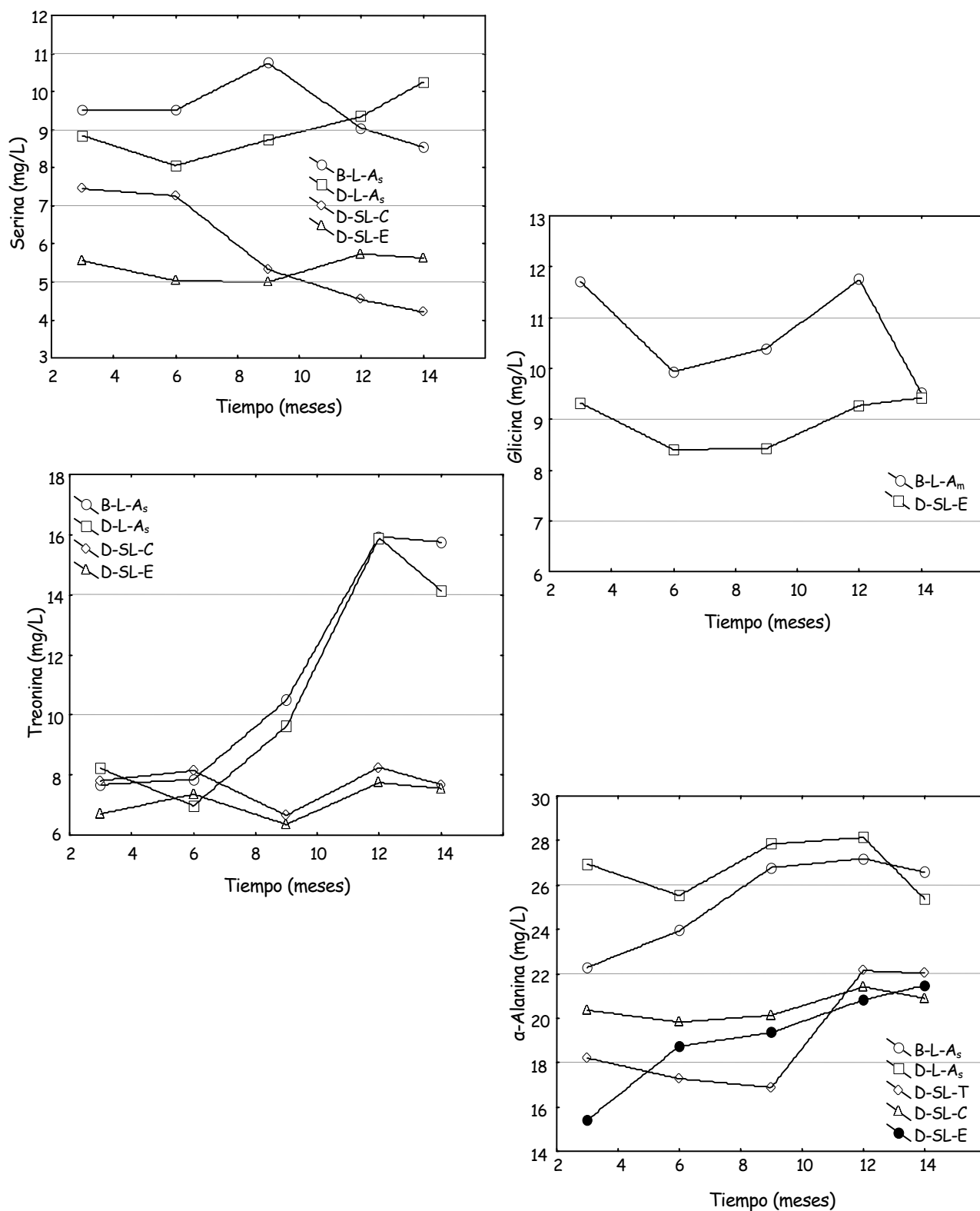


Figura 3.1-3. Evolución de los aminoácidos libres de los lotes de vinos significativamente diferentes, según el test de Scheffe, con relación a las técnicas de elaboración.

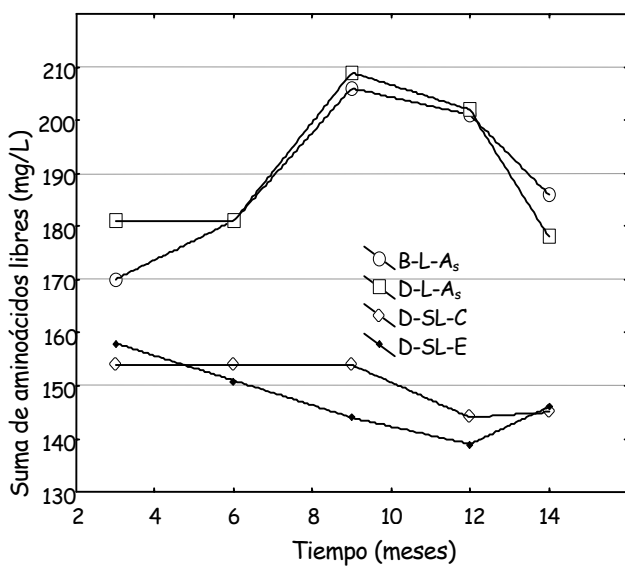
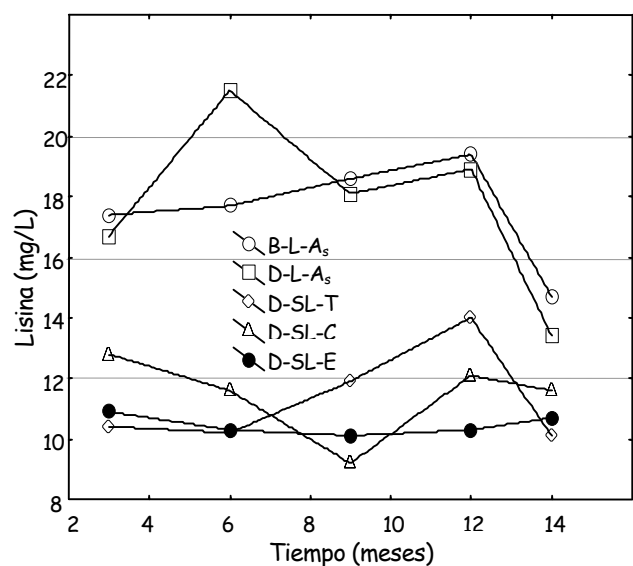
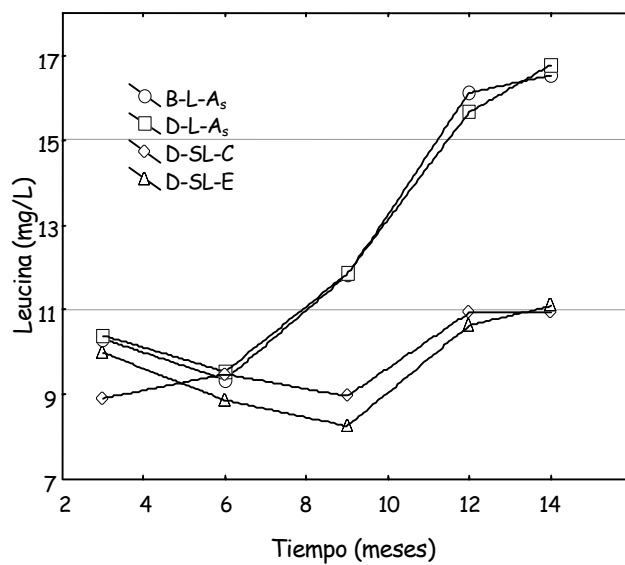
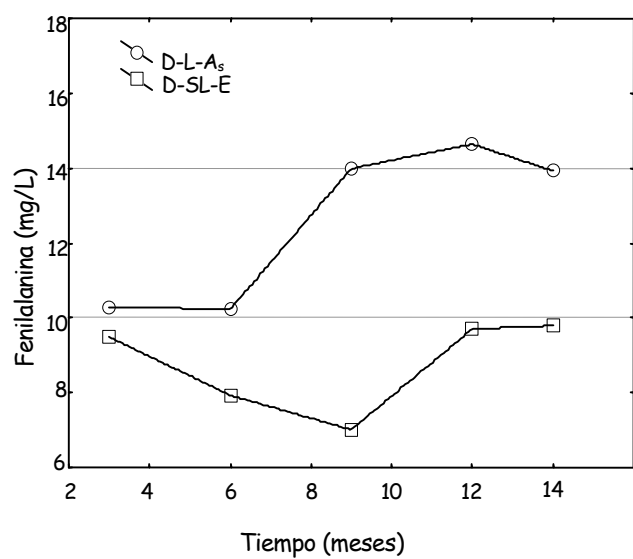


Figura 3.1-3. Continuación.

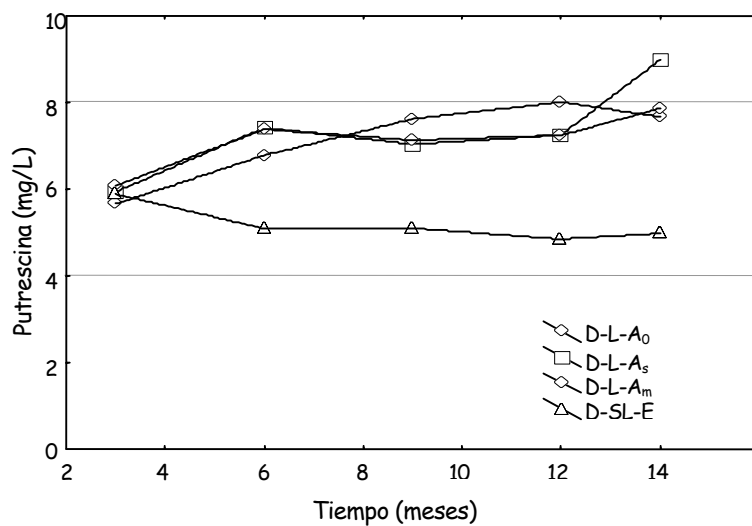
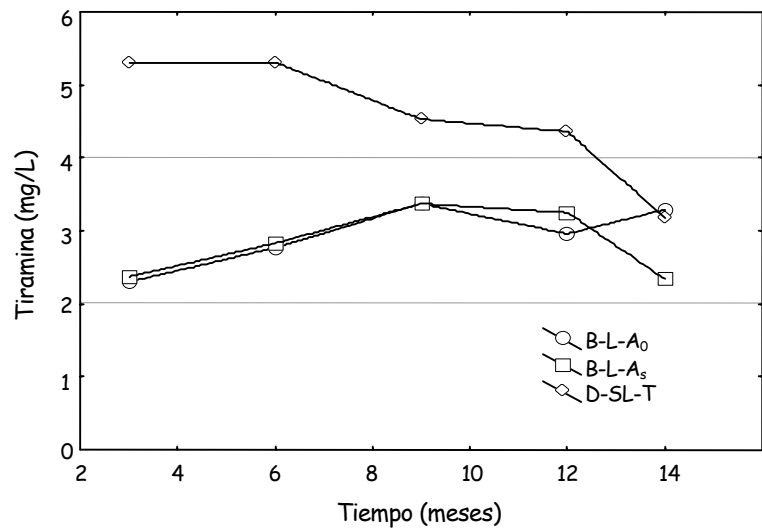
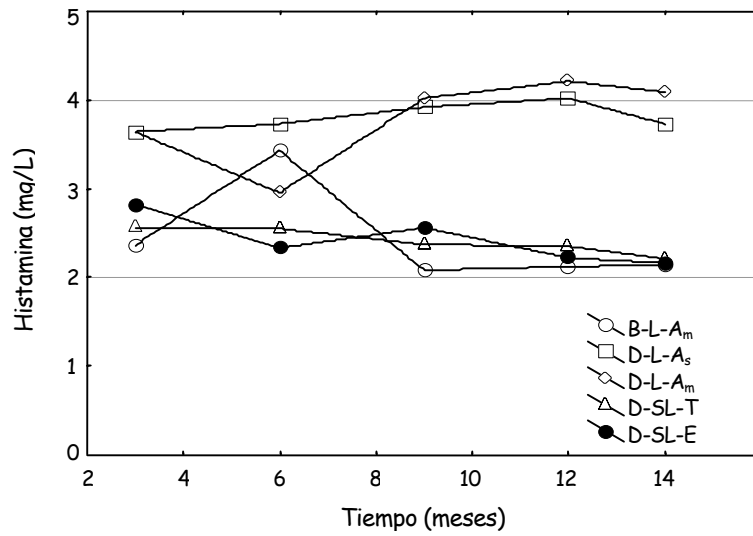


Figura 3.1-4. Evolución de las aminas biógenas de los lotes de vinos significativamente diferentes, según el test de Scheffe, con relación a las técnicas de elaboración.

Tabla 3.1-1A. Valores individuales del contenido en nitrógeno total, aminoácidos libres y aminas biógenas (mg/L) en los vinos fermentados en barrica (FML-B) y en los vinos envejecidos con lías, sin agitar (B-L-A₀), con agitación semanal (B-L-A_s) y con agitación mensual (B-L-A_m).

	B-L-A ₀						B-L-A _s					B-L-A _m				
	FML-B	Meses envejecimiento					Meses envejecimiento					Meses envejecimiento				
		3	6	9	12	14	3	6	9	12	14	3	6	9	12	14
Nitrógeno Total	192,1	194,9	240,8	226,8	236,6	198,9	220,0	227,7	224,0	237,9	202,0	215,6	237,1	232,4	194,0	212,9
Aminoácidos libres																
Asp	10,9	12,0	10,8	12,7	14,0	17,1	9,7	9,8	11,8	16,4	16,4	13,5	11,4	11,1	16,0	16,0
Glu	19,7	20,7	29,2	31,3	26,3	21,0	29,8	26,7	20,3	29,6	29,3	26,4	28,2	22,4	27,3	20,9
Asn	11,5	12,2	11,6	13,7	4,0	5,0	12,8	11,5	12,3	4,3	4,6	13,5	11,7	11,1	4,0	5,9
Ser	8,1	8,6	6,9	8,0	7,0	5,6	9,5	9,5	10,8	9,0	8,5	9,4	7,8	8,0	7,1	4,8
Gln	7,0	n.d.	3,0	n.d.	n.d.	n.d.	2,0	3,0	n.d.	n.d.	n.d.	2,0	3,0	n.d.	n.d.	n.d.
His	7,5	n.d.	3,3	2,3	1,4	1,0	n.d.	3,5	n.d.	1,2	n.d.	n.d.	3,0	n.d.	1,2	n.d.
Gly	8,6	n.d.	8,7	10,8	11,7	9,9	9,6	9,1	11,9	15,8	13,4	11,7	9,9	10,4	11,8	9,5
Thr	10,0	15,7	7,5	7,6	12,7	8,0	7,7	7,9	10,5	15,9	15,8	8,4	7,1	8,6	10,9	7,9
Arg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Ala	n.d.	n.d.	2,0	2,0	n.d.	n.d.	2,0	2,0	n.d.	n.d.	n.d.	2,0	2,0	n.d.	n.d.	n.d.
α-Ala	17,1	17,6	20,9	23,0	23,9	21,5	22,3	23,9	26,8	27,2	26,6	22,9	25,9	21,7	23,9	20,5
Gaba	8,9	9,0	6,7	6,7	8,1	7,4	5,7	7,1	8,8	8,7	6,5	7,9	6,9	7,8	7,6	6,8
Tyr	9,9	9,5	5,3	4,5	n.d.	n.d.	n.d.	5,0	9,3	n.d.	n.d.	n.d.	4,8	8,6	n.d.	n.d.
Met	5,6	5,9	3,1	2,9	1,5	0,8	3,0	3,2	5,9	1,8	1,6	2,9	3,2	5,9	2,1	0,3
Val	8,2	8,5	6,2	6,8	9,3	6,4	6,3	5,7	8,5	9,9	7,8	6,0	6,2	7,8	9,7	5,8
Trp	9,5	9,7	5,4	5,0	4,1	3,5	4,9	5,2	9,7	4,9	5,4	4,8	5,3	9,3	4,4	3,6
Phe	11,3	12,4	8,2	11,3	12,5	10,1	9,7	9,8	13,4	14,2	12,4	11,0	8,8	11,7	12,3	9,5
Ile	7,0	7,2	4,2	4,5	6,3	4,2	4,2	3,8	7,2	6,2	6,9	4,3	4,2	6,8	6,2	4,0
Leu	11,1	11,8	9,7	11,2	12,9	10,7	10,3	9,4	11,8	16,1	16,5	10,6	9,9	10,8	12,6	10,4
Orn	3,0	9,0	8,0	4,0	n.d.	n.d.	3,0	8,0	9,0	n.d.	n.d.	3,0	2,0	3,0	n.d.	n.d.
Lys	12,5	13,9	13,1	12,9	16,5	11,9	17,4	17,7	18,6	19,4	14,7	15,0	16,9	18,0	15,8	11,4
Suma aminoácidos	187,4	183,7	173,8	181,2	172,2	144,1	169,9	181,8	206,6	200,6	186,4	175,3	178,2	183,0	172,9	137,3

n.d.= no detectado; Gaba: ácido γ-aminobutírico.

Tabla 3.1-1A. Continuación.

	B-L-A ₀						B-L-A _s					B-L-A _m				
							Meses envejecimiento									
	FML-B	3	6	9	12	14	3	6	9	12	14	3	6	9	12	14
Aminas biógenas																
Histamina	1,9	2,3	3,1	2,3	2,2	3,2	2,3	3,2	2,3	2,3	2,1	2,4	3,4	2,1	2,1	2,1
Metilamina	0,7	0,8	1,1	0,9	0,5	1,0	0,8	1,1	0,9	1,0	0,8	0,8	1,1	0,9	1,5	0,0
Etilamina	0,8	0,8	1,1	5,7	5,9	4,2	0,9	1,1	5,7	6,0	3,3	0,8	1,0	5,7	5,7	3,3
Tiramina	2,1	2,3	2,8	3,4	3,0	3,3	2,4	2,8	3,4	3,3	2,3	2,5	3,2	4,2	4,9	4,1
2-Feniletilamina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Putrescina	4,1	5,1	6,4	7,5	7,6	7,4	5,4	6,5	7,5	7,2	7,2	5,4	6,8	7,4	7,6	7,0
Cadaverina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Suma de aminas	9,7	11,3	14,4	19,8	19,2	19,1	11,8	14,7	19,8	19,7	15,8	11,9	15,6	20,2	21,8	16,5

n.d.= no detectado.

Tabla 3.1-2A. Valores individuales del contenido en nitrógeno total, aminoácidos libres y aminas biógenas (mg/L) en los vinos fermentados en depósito (FML-D) y en los vinos envejecidos con lías, sin agitar (D-L-A₀), con agitación semanal (D-L-A_s) y con agitación mensual (D-L-A_m).

	D-L-A ₀						D-L-A _s					D-L-A _m				
	FML-D	Meses envejecimiento					Meses envejecimiento					Meses envejecimiento				
		3	6	9	12	14	3	6	9	12	14	3	6	9	12	14
Nitrógeno Total	197,7	203,3	224,0	229,6	197,4	224,8	189,3	226,8	235,2	238,8	195,4	192,1	207,2	226,8	180,9	184,4
Aminoácidos libres																
Asp	10,3	10,9	10,6	11,1	14,9	15,4	16,2	12,3	11,9	16,5	15,4	11,3	11,8	13,2	16,5	12,6
Glu	17,6	30,6	30,3	22,7	26,1	20,8	26,7	29,0	24,7	28,3	25,8	25,3	29,6	22,7	22,4	22,2
Asn	11,0	12,4	12,7	11,7	5,2	5,0	13,0	12,5	12,2	5,4	4,2	15,4	12,5	10,8	4,3	4,3
Ser	7,7	8,0	8,0	8,4	6,7	5,7	8,8	8,1	8,7	9,3	10,3	9,7	8,0	10,0	6,5	5,5
Gln	8,0	1,0	3,0	n.d.	n.d.	n.d.	2,0	3,0	n.d.	n.d.	n.d.	2,0	2,0	n.d.	n.d.	n.d.
His	7,9	n.d.	n.d.	n.d.	1,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,2	n.d.	3,0	n.d.	n.d.	1,2	n.d.
Gly	10,0	9,9	9,9	10,6	11,9	8,9	10,5	9,4	11,1	16,9	12,1	9,9	10,2	9,8	10,8	8,9
Thr	8,4	8,0	8,6	9,2	9,8	7,4	8,2	7,0	9,6	15,9	14,1	8,0	7,6	10,7	9,5	6,8
Arg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Ala	n.d.	1,0	2,0	n.d.	n.d.	n.d.	2,0	2,0	4,0	n.d.	n.d.	2,0	2,0	n.d.	n.d.	n.d.
α-Ala	14,6	21,5	22,3	22,8	23,6	20,2	26,9	25,5	27,8	28,1	25,4	23,3	21,5	25,7	22,9	20,0
Gaba	9,2	7,7	7,5	8,1	7,9	6,9	7,3	6,8	8,4	9,0	7,3	7,3	6,0	7,6	7,5	6,8
Tyr	n.d.	n.d.	n.d.	7,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,3	n.d.	n.d.	5,2	4,3	7,1	n.d.	n.d.
Met	5,0	3,2	3,5	5,9	1,6	0,4	2,5	3,0	6,0	1,0	1,3	2,5	3,1	5,9	1,1	0,3
Val	7,4	6,9	6,3	8,0	9,4	5,8	6,3	6,5	8,3	9,5	6,1	6,8	6,6	7,6	9,1	5,8
Trp	9,6	5,1	5,2	9,4	4,1	3,6	5,1	5,2	9,6	5,8	6,7	5,4	5,3	9,3	4,1	3,6
Phe	10,9	11,2	10,4	13,1	11,9	9,1	10,3	10,2	14,0	14,6	13,9	10,6	10,2	11,1	10,8	9,0
Ile	6,1	2,2	4,4	7,0	6,1	3,8	4,4	4,3	7,2	6,1	5,1	4,7	4,4	6,7	5,8	3,9
Leu	10,3	10,1	10,2	11,5	12,6	9,9	10,4	9,5	11,9	15,7	16,8	11,2	10,3	10,8	11,8	10,1
Orn	8,0	3,0	7,0	8,0	n.d.	n.d.	3,0	6,0	8,0	n.d.	n.d.	3,0	7,0	8,0	n.d.	n.d.
Lys	10,6	15,5	12,5	15,7	14,4	11,2	16,7	21,5	18,1	18,9	13,4	13,2	12,7	18,5	12,8	10,9
Suma aminoácidos	172,6	168,2	174,4	190,5	167,5	134,1	180,3	181,8	208,8	202,2	177,9	179,8	175,1	195,5	157,1	130,7

n.d.= no detectado; Gaba: ácido γ-aminobutírico.

Tabla 3.1-2A. Continuación.

	FML-D	D-L-A ₀					D-L-A _s					D-L-A _m				
		Meses envejecimiento														
		3	6	9	12	14	3	6	9	12	14	3	6	9	12	14
Aminas biógenas																
Histamina	1,8	3,5	3,6	3,2	3,5	3,9	3,6	3,7	3,9	4,0	3,7	3,6	1,9	4,9	4,2	4,1
Metilamina	0,8	0,8	0,8	1,2	1,1	1,0	0,8	1,0	1,3	1,0	1,4	0,8	0,8	1,1	1,2	1,2
Etilamina	0,8	0,9	2,6	6,9	7,6	4,2	0,9	6,2	5,6	5,2	4,1	0,9	5,8	6,2	6,5	4,9
Tiramina	2,0	3,5	4,0	4,2	5,2	3,3	3,5	4,2	4,0	4,6	3,0	3,5	4,0	4,2	4,2	4,1
2-Feniletilamina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Putrescina	4,1	5,7	6,8	7,6	8,0	7,7	5,9	7,4	7,0	7,3	9,0	6,1	7,4	7,1	7,2	7,9
Cadaverina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Suma de aminas	9,5	14,3	17,8	23,1	25,5	20,1	14,8	22,7	21,9	22,1	21,2	15,0	19,9	23,4	23,4	22,1

n.d.= no detectado.

Tabla 3.1-3A. Valores individuales del contenido en nitrógeno total, aminoácidos libres y aminos biógenas (mg/L) en los vinos fermentados en depósito de acero (FML-D) y en los vinos envejecidos sin lías, sin agitar (D-SL-T), con agitación semanal (D-SL-C) y con agitación mensual (D-SL-E).

	FML-D	D-SL-T						D-SL-C						D-SL-E					
								Meses envejecimiento											
		0	3	6	9	12	14	0	3	6	9	12	14	0	3	6	9	12	14
Nitrógeno Total	197,7	220,0	216,5	215,6	212,4	219,4	214,6	218,0	229,6	224,0	224,3	206,6	199,6	216,0	229,6	224,0	225,6	216,6	197,0
Aminoácidos libres																			
Asp	10,3	16,9	13,8	15,3	13,2	14,8	13,6	14,4	8,8	10,9	17,1	10,5	13,3	15,4	15,8	15,8	16,2	10,3	14,3
Glu	17,6	18,0	32,1	31,7	21,2	24,0	21,5	14,1	24,2	26,6	19,6	23,0	22,1	18,7	22,4	20,9	19,8	24,5	21,6
Asn	11,0	12,3	12,6	12,8	12,5	5,6	4,1	9,6	11,2	11,7	15,2	6,8	6,7	16,4	12,8	12,2	12,0	4,3	5,2
Ser	7,7	6,3	7,5	7,8	7,5	5,8	6,1	8,7	7,5	7,3	5,3	4,5	4,2	4,8	5,6	5,0	5,0	5,7	5,6
Gln	8,0	5,0	2,0	2,0	3,0	n.d.	n.d.	5,0	3,0	2,0	2,0	n.d.	n.d.	6,0	2,0	2,0	2,0	n.d.	n.d.
His	7,9	5,3	3,2	2,0	n.d.	1,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,2	n.d.
Gly	10,0	5,9	9,7	10,2	10,6	11,4	9,2	9,8	9,6	8,3	9,0	10,0	9,6	7,7	9,3	8,4	8,4	9,3	9,4
Thr	8,4	6,4	8,7	8,7	9,5	10,0	7,3	8,9	7,8	8,1	6,7	8,3	7,7	5,4	6,7	7,4	6,4	7,7	7,6
Arg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-Ala	n.d.	1,0	2,0	2,0	1,0	n.d.	n.d.	4,0	2,0	2,0	1,0	n.d.	n.d.	1,0	2,0	2,0	2,0	n.d.	n.d.
α-Ala	14,6	14,6	18,2	17,3	16,9	22,1	22,0	18,2	20,4	19,8	20,1	21,4	20,9	18,7	15,4	18,7	19,4	20,8	21,5
Gaba	9,2	9,4	6,8	7,4	7,1	7,7	5,9	7,0	8,1	6,5	6,3	7,2	7,2	6,6	7,2	5,9	5,3	6,6	6,2
Tyr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,2	n.d.	n.d.	1,5	3,0	2,9	2,2	n.d.	n.d.
Met	5,0	4,6	3,3	3,3	3,3	1,6	0,5	3,6	3,1	2,9	3,7	1,0	7,4	6,6	3,2	2,9	3,0	0,8	7,4
Val	7,4	8,7	7,3	7,0	5,3	9,0	9,3	2,7	5,4	5,9	6,0	7,9	5,3	6,2	6,4	5,6	5,3	8,2	6,7
Trp	9,6	6,8	5,5	5,3	5,7	4,2	4,0	6,4	4,9	4,8	4,2	3,6	3,6	2,7	5,4	4,8	4,2	3,7	3,7
Phe	10,9	11,3	10,7	11,2	13,2	10,9	8,0	9,9	9,8	9,2	7,4	10,1	9,5	10,8	9,5	7,9	7,0	9,7	9,8
Ile	6,1	5,2	4,5	4,9	5,7	7,4	6,4	5,9	3,9	3,7	6,3	5,1	5,0	2,2	4,4	3,9	3,2	5,2	5,6
Leu	10,3	13,8	11,5	11,2	11,2	13,9	10,7	10,5	8,9	9,5	9,0	10,9	10,9	10,0	10,0	8,9	8,3	10,6	11,1
Orn	8,0	7,0	5,0	5,0	6,0	n.d.	n.d.	7,0	3,0	3,0	5,0	n.d.	n.d.	9,0	6,0	6,0	5,0	n.d.	n.d.
Lys	10,6	10,2	10,4	10,2	11,9	14,0	10,1	10,4	12,8	11,6	9,2	12,1	11,6	10,4	10,9	10,3	10,1	10,3	10,7
Suma aminoácidos	172,6	168,7	174,8	175,3	164,8	163,6	138,7	156,1	154,4	153,8	153,3	143,5	145,0	160,1	158,0	151,5	144,8	138,9	146,4

n.d.= no detectado; Gaba: ácido γ-aminobutírico.

Tabla 3.1-3A. Continuación.

	FML-D	D-SL-T						D-SL-C						D-SL-E					
								Meses envejecimiento											
		0	3	6	9	12	14	0	3	6	9	12	14	0	3	6	9	12	14
Aminas biógenas																			
Histamina	1,8	3,6	2,6	2,6	2,4	2,4	2,2	3,4	2,3	3,6	3,0	3,7	2,9	2,8	2,8	2,3	2,6	2,2	2,2
Metilamina	0,8	0,8	1,3	1,3	0,9	1,0	0,2	0,8	1,2	0,9	1,0	0,9	0,5	0,9	1,1	0,9	1,1	1,0	1,9
Etilamina	0,8	0,8	1,1	1,1	5,8	5,0	4,1	0,8	1,1	5,8	5,4	5,2	5,0	1,2	1,1	5,8	4,6	2,2	2,4
Tiramina	2,0	3,7	5,3	5,3	4,5	4,4	3,2	3,6	4,9	4,2	4,4	4,2	4,2	5,4	4,4	3,7	3,2	3,0	3,0
2-Feniletilamina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Putrescina	4,1	5,9	6,9	6,9	5,8	5,9	5,1	5,9	5,3	5,5	5,6	6,0	5,9	5,9	5,9	5,1	5,1	4,8	5,0
Cadaverina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Suma de aminas	9,5	14,7	17,2	17,2	19,4	18,6	14,8	14,5	14,7	20,1	19,3	20,0	18,5	16,1	15,3	17,8	16,6	13,3	14,4

n.d.= no detectado.

3.1.1.3. Variación de la fracción peptídica del vino durante la fermentación maloláctica e influencia del envejecimiento con y sin lías.

Debido a la complejidad del análisis de los péptidos, no ha sido posible abordar el estudio de todas las muestras disponibles, por lo que se han seleccionado aquellas que corresponden a las principales etapas de la elaboración y a los de mayor tiempo de envejecimiento. Por tanto, se ha estudiado el vino inicial, los dos vinos obtenidos después de la fermentación maloláctica (FML-D y FML-B) y los vinos que han sido envejecidos durante 12 meses en barrica, en ausencia de lías (D-SL-E12) o en presencia de lías con agitación semanal (D-L-A_s12 y B-L-A_s12). Los detalles de la obtención de estos vinos y las claves utilizadas para su identificación se recogen en el apartado 2.1.1. de materiales y métodos.

La fracción nitrogenada del vino está formada mayoritariamente por aminoácidos libres, péptidos y proteínas, constituyendo el nitrógeno proteico, generalmente, menos del 1% del nitrógeno total (Moreno-Arribas y col., 1996). Por tanto, y ante la ausencia de métodos fiables de determinación del nitrógeno peptídico y del proteico de los vinos tintos, el nitrógeno peptídico se puede estimar como la diferencia entre el nitrógeno total y el nitrógeno de los aminoácidos libres.

En la figuras 3.1-5 se muestra la concentración del nitrógeno peptídico en el vino inicial (Vi), en los vinos después de la fermentación maloláctica (FML-D y FML-B) y en los vinos después de 12 meses de envejecimiento en barrica (D-SL-E12, D-L-A_s12 y B-L-A_s12). Como se puede observar, se produce una disminución de éstos en los vinos al final de la fermentación maloláctica, debido al consumo por parte de las levaduras. Durante el envejecimiento en barrica aumentó el contenido de nitrógeno peptídico de los vinos, siendo este incremento mayor en los vinos envejecidos con lías. La actividad proteásica de las bacterias lácticas, que se pone de manifiesto de forma especial cuando se desarrolla en medios deficientes en nitrógeno, hace que se liberen aminoácidos y péptidos al vino (Manca de Nadra y col., 1999).

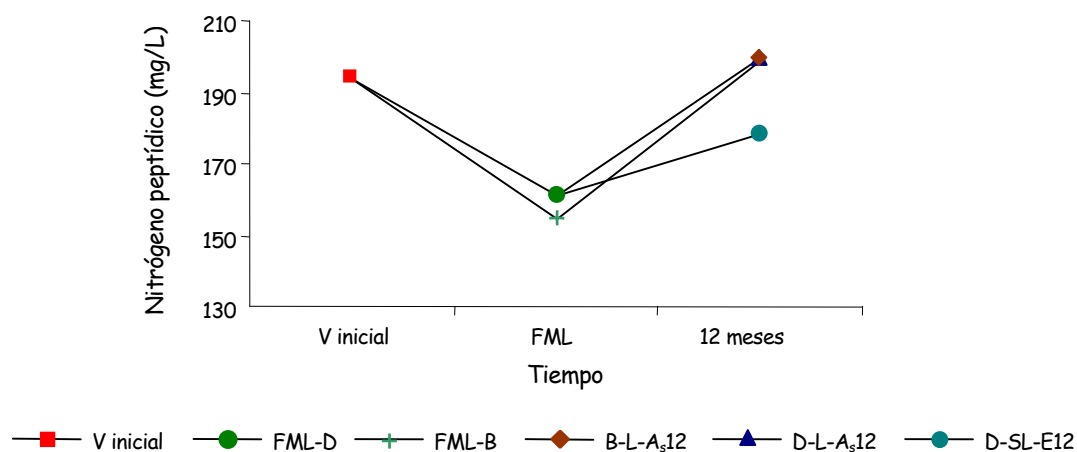


Figura 3.1-5. Concentración de nitrógeno peptídico en las muestras de vino tinto estudiadas.

3.1.1.3.a. Fraccionamiento de los péptidos.

Debido a la complejidad del vino, es necesario, para el estudio de los péptidos, realizar sucesivas etapas de fraccionamiento con el fin de eliminar, en la medida de lo posible, las sustancias que interfieren en su análisis. En primer lugar, es necesario eliminar los compuestos de alto peso molecular (HMWN). Para ello, como primera etapa para el estudio de los péptidos, el vino se pasó por una columna de Sephadex LH-20. Esta fase estacionaria está basada en un lecho con uniones cruzadas de dextrano hidroxipropilado y actúa como gel de exclusión molecular y de reparto. En las condiciones utilizadas, los compuestos mayores de 4000 Da eluyen junto al volumen de exclusión y la mayoría de los compuestos polifenólicos son retenidos en la columna (Amersham Biosciences, Application note 18-1107-22). Sin embargo, algunos aminoácidos eluyen junto con los péptidos (Acedo y col., 1994). Para separar estos compuestos de los péptidos de interés, la fracción eluida después del volumen de exclusión de la columna de Sephadex LH-20, una vez concentrada, se pasó por una columna Cosmosil 140 C₁₈-OPN para separar los compuestos más polares que eluyen con agua (F1), de los menos polares que eluyen con etanol al 10% (F2) quedando retenidos en la columna la mayoría de los compuestos fenólicos que pudieran haber eluido después del paso de la muestra por la columna de Sephadex LH-20. Ambas fracciones, F1 y F2, se cromatografiaron, posteriormente, mediante HPLC.

3.1.1.3.b. Evolución y composición de los péptidos más polares.

En la figura 3.1-6 se muestra, a modo de ejemplo, el cromatograma obtenido por HPLC de la fracción F1 de uno de los vinos analizados. El análisis de los aminoácidos libres y totales junto con el análisis de los espectros de ultravioleta obtenidos a lo largo del cromatograma, nos indica que en los primeros cinco minutos del cromatograma (figura 3.1-6, zona I), eluyen los aminoácidos libres, en la zona comprendida entre el minuto 5 y el 14 (figura 3.1-6, zona II) eluyen la mayoría de los péptidos y a partir de los 14 minutos (figura 3.1-6, zona III) eluyen algunos compuestos fenólicos. Por tanto, para el estudio de los péptidos, solo se han tenido en consideración los compuestos que eluyen en la zona II de los cromatogramas.

En la tabla 3.1-3 se muestran las áreas de los picos detectados en la zona II de la fracción F1, en cada una de las muestras estudiadas, así como la suma de las áreas de todos los picos. Algunos de los picos (#3 y #4, #8 y #9, #11 y #12, y #18 y #19) aparecen solapados en algunos cromatogramas por lo que la medida de su área se ha expresado por su suma. Se han detectado un total de 20 picos. Los picos #1, #(3+4), #(8+9), #10, #(11+12), #14 y #16, están en todos los vinos. En el vino inicial, aparecen un total de 14 picos, siendo los mayoritarios el #16, el #10 y el #(8+9).

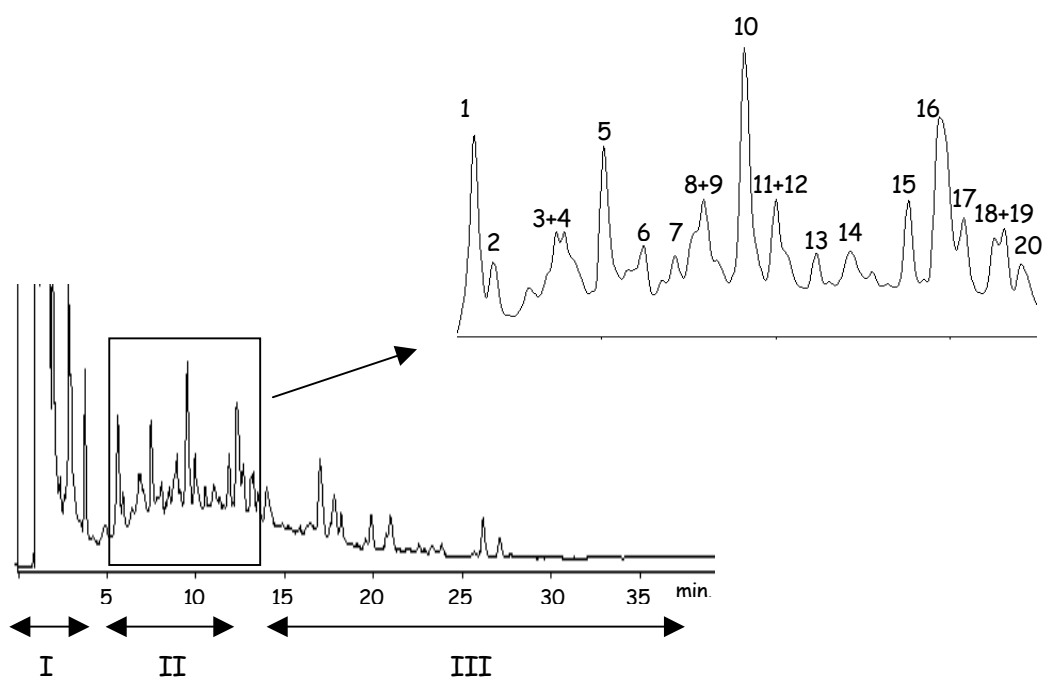


Figura 3.1-6. Cromatograma de RP-HPLC de la fracción F1 del vino tinto, eluida con agua de la columna de Cosmosil 140 C₁₈-OPN. I= aminoácidos libres + péptidos. II= péptidos, III= Compuestos fenólicos + péptidos. La zona de interés ha sido ampliada.

En las fracciones F1 de los vinos que han realizado la fermentación maloláctica tanto en depósito (vino FML-D), como en barrica (vino FML-B), es menor la suma de las áreas, 2034 y 2285, respectivamente, que en el vino inicial, 3921. Estos resultados indican que durante la fermentación maloláctica se produce una disminución de los péptidos (disminución de la suma de las áreas) que, probablemente, utilizan las bacterias lácticas como fuente nitrogenada, lo que concuerda con los datos obtenidos en la determinación del nitrógeno peptídico de estos vinos (figura 3.1-5). Durante el envejecimiento en barrica aumenta tanto el número de picos como su intensidad en todos los vinos, obteniéndose los valores mayores en el vino que ha realizado la fermentación maloláctica en barrica y ha envejecido 12 meses con las lías (vino B-L-A_s12). Estos resultados indican que durante el envejecimiento del vino con o sin lías hay una actividad proteásica residual que produce una liberación de péptidos al vino siendo ésta mayor en los vinos envejecidos con lías (vinos D-L-A_s12 y B-L-A_s12).

Tabla 3.1-3. Áreas de los picos de los cromatogramas de la fracción F1 (zona II) obtenida de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, de los vinos tintos estudiados.

Número de pico	Vino inicial	Vino después de la FML		Vinos después de 12 meses en barrica		
*	Vi	FML-D	FML-B	D-SL-E12	D-L-A _s 12	B-L-A _s 12
1	236	154	146	587	882	1419
2	n.d.	n.d.	n.d.	109	n.d.	n.d.
3+4	213	120	172	465	683	640
5	n.d.	39	n.d.	421	664	755
6	119	42	n.d.	170	129	254
7	n.d.	n.d.	n.d.	95	92	58
8+9	592	404	462	447	180	227
10	838	326	414	806	798	954
11+12	264	167	183	320	384	368
13	n.d.	n.d.	n.d.	97	76	70
14	414	115	299	125	252	110
15	n.d.	n.d.	n.d.	227	161	163
16	903	500	609	690	768	831
17	n.d.	n.d.	n.d.	118	60	110
18+19	214	44	n.d.	319	217	131
20	129	122	n.d.	119	134	186
Suma de áreas	3921	2034	2285	5116	5481	6276

*Para la identificación de los picos ver figura 3.1-6; n.d. = no detectado.

Con el fin de conocer la composición en aminoácidos de los péptidos más polares (fracción F1) se ha realizado la determinación de aminoácidos libres y totales, mediante HPLC, de esta fracción estimándose como aminoácidos de los péptidos la diferencia de los resultados de estas dos determinaciones. En la tabla 3.1-4 se muestra la distribución molar de los aminoácidos de los péptidos de esta fracción. Los aminoácidos mayoritarios de los péptidos más polares del vino inicial son ácido aspártico y/o asparagina, ácido glutámico y/o glutamina, serina, glicina, α -alanina y tirosina. Estos aminoácidos constituyen, aproximadamente, el 80% del total de los aminoácidos de la fracción F1. Estos aminoácidos son también los mayoritarios detectados en péptidos de vinos por Moreno-Arribas y col., (1998b) y Desportes y col., (2000). También se han detectado en esta fracción los aminoácidos treonina, arginina, valina, isoleucina y leucina. Estos aminoácidos están descritos como constituyentes de los péptidos de los vinos por diversos autores (Yokotsuka y col., 1975; Usseglio-Tomasset y Bosia, 1990; Acedo y col., 1994).

La distribución de los aminoácidos de los péptidos de los vinos que han realizado la fermentación maloláctica en depósito (FML-D), es similar a la de los péptidos del vino inicial (Vi), con excepción del aminoácido tirosina e isoleucina, siendo el primero de ellos uno de los mayoritarios de los péptidos del vino inicial. En el estudio realizado sobre el metabolismo de los aminoácidos libres y la formación de aminas biógenas en estos mismos vinos (Alcaide-Hidalgo y col., 2007), se comprobó que durante la fermentación maloláctica disminuyó el contenido de tirosina, de 9,3 a 1,5 mg/L y se formaron 3,4 mg/L de tiramina, lo que unido a que la tirosina es un aminoácido esencial para *Oenococcus oeni* (Remize y col., 2006) podría ser la causa de la no detección de tirosina en estos péptidos. En los aminoácidos que forman los péptidos de los vinos que realizaron la fermentación maloláctica en la bodega (FML-B), es de destacar el notable incremento de la glicina y la detección de histidina, ornitina y lisina, aminoácidos que no formaban parte de los péptidos más polares del vino inicial. Estos aminoácidos podrían proceder de la hidrólisis de proteínas o péptidos de mayor tamaño llevada a cabo por las bacterias lácticas o las levaduras.

La distribución de los aminoácidos de los péptidos más polares, en el vino que envejece sin lías (D-SL-E12), es análoga a la de los péptidos del vino del que procede (FML-D), con la excepción de los aminoácidos treonina y arginina que no se han detectado en los péptidos de este vino y la aparición de tirosina e isoleucina. La distribución de los aminoácidos de los péptidos de los vinos envejecidos con lías (vinos D-L-A_s12 y B-L-A_s12), es diferente de la del vino control (vino D-SL-E12) y distinta, además, de la de los vinos de los que proceden (vinos FML-D y FML-B), siendo de destacar el incremento en glicina y lisina en el vino D-L-A_s12 y el incremento de

ácido aspártico y/o asparagina, ácido glutámico y/o glutamina, α -alanina y tirosina en el vino B-L-A_s12. No se han detectado incrementos notables de los aminoácidos treonina y serina, aminoácidos mayoritarios de las manoproteínas de las levaduras (Goncalves y col., 2002), lo que indica que no hay péptidos en la fracción F1 procedentes de la autólisis de levaduras. Estos péptidos podrían proceder de la lisis de las bacterias o bien de la hidrólisis de los polipéptidos o de las proteínas de la uva.

Tabla 3.1-4. Distribución molar (%) de los aminoácidos de los péptidos de la fracción F1 obtenida de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, de los vinos tintos estudiados.

	Vino inicial	Vino después de la FML		Vinos después de 12 meses en bodega		
	Vi	FML-D	FML-B	D-SL-E12	D-L-A _s 12	B-L-A _s 12
Asx	12,3	18,6	3,7	12,6	4,4	10,1
Glx	17,4	20,6	8,0	22,1	10,4	12,5
Ser	9,2	14,4	7,7	9,2	6,7	8,3
His	n.d.	n.d.	6,0	n.d.	n.d.	n.d.
Gly	12,2	7,3	34,1	16,3	26,5	9,8
Thr	5,2	8,8	3,4	n.d.	9,7	5,8
Arg	4,1	5,8	4,3	n.d.	2,7	2,8
β -Ala	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α -Ala	17,2	15,6	9,4	17,1	10,3	16,5
Gaba	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,0	2,3
Tyr	11,0	n.d.	3,7	5,9	6,0	16,2
Val	5,0	4,8	3,1	6,2	3,7	4,5
Phe	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ile	2,3	n.d.	n.d.	4,2	n.d.	2,9
Leu	4,1	4,1	2,7	6,4	3,7	5,9
Orn	n.d.	n.d.	4,6	n.d.	n.d.	n.d.
Lys	n.d.	n.d.	9,3	n.d.	12,9	2,4

n.d. = no detectado; Gaba = ácido γ -aminobutírico.

3.1.1.3.c. Evolución y composición de los péptidos menos polares.

También se ha realizado el análisis por HPLC de los péptidos menos polares, que eluyeron con etanol al 10% (fracción F2). En la figura 3.1-7 se muestra el cromatograma obtenido de esta fracción F2, de uno de los vinos analizados, la cual no contiene aminoácidos libres ni

polifenoles, por lo cual, en este caso, se consideró todo el cromatograma. Se han detectado en total 23 picos, un número, aproximadamente, igual que en la fracción F1 (figura 3.1-6). En la tabla 3.1-5 se muestran las áreas de los picos detectados en la fracción F2 de todos los vinos. En el vino inicial se han detectado 6 picos más que en la fracción F1 (tabla 3.1-4), pero su intensidad es menor. Los picos mayoritarios, picos #20-22, aparecen en la última parte del cromatograma, es decir, en la zona de los más hidrófobos.

El perfil cromatográfico de los péptidos de la fracción F2 del vino que ha realizado la fermentación maloláctica en depósito (vino FML-D) es algo diferente de la del vino inicial (Vi). No se ha detectado el pico #1 y hay tres picos que no estaban en el vino inicial, picos #2, #4 y #7. Sin embargo, la suma de sus áreas es casi un 30% de la suma de las áreas de los picos de la fracción F2 del vino inicial. La intensidad de los picos en el cromatograma del vino que realizó la fermentación maloláctica en barrica (vino FML-B) es mucho mayor que la de los picos del vino que la ha realizado en depósito (vino FML-D), e incluso que la del vino inicial (Vi). Los perfiles cromatográficos de la fracción F2 de los vinos después del envejecimiento en barrica, son muy diferentes a los de los vinos al finalizar la fermentación maloláctica. El vino D-SL-E12, vino control, que se sometió a tratamientos de trasiego, clarificación y estabilización al finalizar la fermentación maloláctica, tiene un número de picos mucho menor que el vino del que procede (FML-D) pero su intensidad es algo mayor. Esto pone de manifiesto la existencia de actividad proteasa residual en el vino, incluso en ausencia de levaduras o bacterias.

Durante el envejecimiento de los vinos en barrica con las lías, aumentó en gran medida la intensidad de los picos, siendo de destacar el aumento de los picos del vino que realizó la fermentación maloláctica en barrica y envejeció con lías (vino B-L-A_s12).

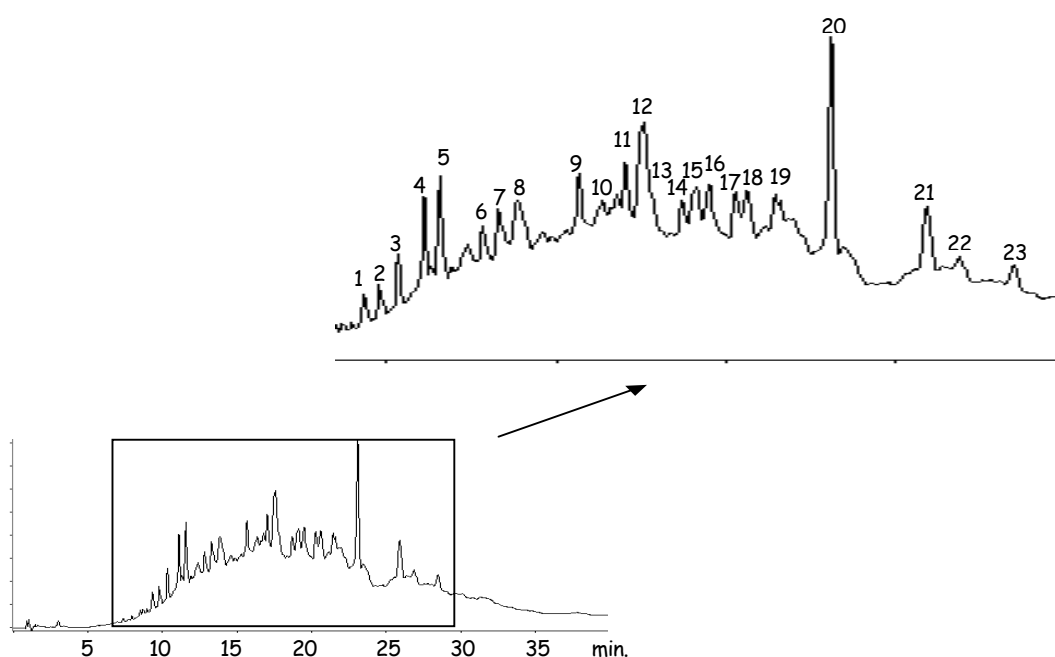


Figura 3.1-7. Cromatograma de RP-HPLC de la fracción F2 del vino tinto, eluida con etanol al 10% de la columna de Cosmosil 140 C_{18} -OPN. La zona de interés ha sido ampliada.

Tabla 3.1-5. Áreas de los picos de los cromatogramas de la fracción F2 obtenida de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, de los vinos tintos estudiados.

Numero de pico	Vino inicial	Vino después de la FML		Vinos después de 12 meses en barrica		
*	Vi	FML-D	FML-B	D-SL-E12	D-L-A _s 12	B-L-A _s 12
1	109	n.d.	57	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	25	64	n.d.	n.d.	n.d.
3	41	28	86	n.d.	n.d.	n.d.
4	n.d.	62	145	n.d.	n.d.	151
5	74	48	164	n.d.	53	208
6	48	23	71	n.d.	n.d.	n.d.
7	n.d.	27	117	n.d.	113	190
8	62	67	185	n.d.	57	114
9	193	47	131	130	235	782
10	70	25	56	66	122	413
11	63	32	93	n.d.	n.d.	n.d.
12	75	58	416	62	125	433
13	37	20	25	n.d.	41	142
14	72	25	54	n.d.	27	64
15	96	29	95	71	88	177
16	32	24	113	n.d.	251	1836
17	43	37	79	n.d.	n.d.	175
18	126	45	83	93	399	917
19	49	31	112	217	291	653
20	472	142	525	640	959	3848
21	482	30	189	362	106	1285
22	246	24	62	n.d.	n.d.	126
23	105	12	77	154	25	274
Suma de áreas	2496	860	2998	1795	2894	11787

*Para la identificación de los picos, ver la figura 3.1-7; n.d. = no detectado

También se ha realizado el análisis de los aminoácidos que constituyen los péptidos de la fracción F2. Los resultados se muestran en la tabla 3.1-6. Estos péptidos tienen una menor proporción de los aminoácidos más polares, ácido aspártico y/o asparagina y ácido glutámico y/o glutamina, y mayor de los aminoácidos menos polares, isoleucina y leucina, que los de la fracción F1 (tabla 3.1-4), como era de esperar.

En el vino inicial hay mayor proporción de glicina y menor de tirosina que en la fracción F1 de este mismo vino. En esta fracción, además, se han detectado β -alanina, fenilalanina y lisina que no se habían detectado en la fracción F1. No se han observado modificaciones importantes

en la distribución de los aminoácidos que constituyen los péptidos, ni por efecto de la fermentación maloláctica, ni por el envejecimiento con o sin lías.

Tabla 3.1-6. Distribución molar (%) de los aminoácidos de los péptidos de la fracción F2 obtenida de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, de los vinos tintos estudiados.

	Vino inicial	Vino después de la FML		Vinos después de 12 meses en barrica		
	Vi	FML-D	FML-B	D-SL-E12	D-L-A _s 12	B-L-A _s 12
Asx	6,9	7,6	7,1	8,7	8,6	3,6
Glx	10,7	8,6	10,5	10,6	7,3	2,2
Ser	6,1	4,6	7,0	9,1	7,3	1,3
His	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,3	0,7
Gly	20,7	18,7	18,8	17,4	9,8	23,2
Thr	6,6	5,8	6,3	6,9	7,3	2,7
Arg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,1	1,8
β-Ala	0,7	0,7	0,6	0,3	n.d.	1,3
α-Ala	13,2	15,4	12,0	9,8	7,5	19,2
Gaba	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tyr	3,0	2,4	2,9	3,1	6,5	4,7
Val	7,4	10,1	8,7	8,4	7,2	10,2
Phe	3,1	3,3	3,3	3,6	3,9	3,9
Ile	6,1	7,1	7,1	8,3	6,8	9,2
Leu	10,4	10,3	10,5	10,5	7,9	11,2
Orn	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lys	5,1	5,4	5,2	3,3	7,5	4,8

n.d. = no detectado; Gaba = ácido γ-aminobutírico.

3.1.1.3.d. Composición en monosacáridos de los polisacáridos de las fracciones peptídicas.

Los péptidos de los vinos pueden proceder de las proteínas de las uvas o de las levaduras. En ambos casos, se trata de glicoproteínas (Marchal y col., 1996; Nunez y col., 2006). Por tanto, es razonable suponer que los péptidos del vino sean glicopéptidos. Para comprobar este hecho, se ha realizado la determinación de la composición en monosacáridos libres y

después de la hidrólisis de las fracciones F1 y F2. No se detectaron monosacáridos libres en ninguna de las fracciones, por tanto solo había polisacáridos. La distribución molar de los polisacáridos de las fracciones F1 y F2 se muestra en las tablas 3.1-7 y 3.1-8, respectivamente.

En los polisacáridos de la fracción F1 (tabla 3.1-7) se han detectado los monosacáridos arabinosa, ramnosa, galactosa, xilosa y glucosa. Tanto en el vino inicial como en los vinos después de la fermentación maloláctica, el azúcar mayoritario de los polisacáridos es la glucosa, de 53,6 a 67,9%, seguido de la arabinosa con una relación de glucosa/arabinosa de 2,3 a 5,3. Después del envejecimiento en barrica aumenta el contenido en arabinosa y disminuye el contenido de glucosa convirtiéndose su relación en 0,4 de valor medio. Esta descrito que los polisacáridos constituidos por arabinosa son característicos de los vinos tintos (Vidal y col., 2003; Doco y col., 2003). La no detección de manosa en estos polisacáridos indica que no proceden de las manoproteínas de las levaduras lo que concuerda con los resultados obtenidos de la determinación de aminoácidos de los péptidos.

Tabla 3.1-7. Distribución molar (%) de los monosacáridos de los polisacáridos de la fracción F1 obtenida de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, de los vinos tintos estudiados.

	Vino inicial	Vino después de la FML		Vinos después de 12 meses en barrica	
	Vi	FML-D	FML-B	D-L-A _s 12	B-L-A _s 12
Arabinosa	12,9	14,3	23,6	55,1	42,1
Manosa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ramnosa	5,9	12,8	13,9	14,2	19,3
Galactosa	9,7	6,0	8,9	6,6	16,0
Xilosa	3,6	4,7	n.d.	n.d.	6,4
Glucosa	67,9	62,2	53,6	24,1	16,2

n.d. = no detectado

En los polisacáridos de la fracción F2 (tabla 3.1-8) se han detectado los mismos monosacáridos que en la fracción F1 y, además, manosa. También los monosacáridos mayoritarios de esta fracción, en todos los vinos, son la glucosa y la arabinosa con una relación menor de 2 en todos ellos, con excepción del vino que realizó la fermentación maloláctica en barrica y envejeció 12 meses con las lías (B-L-A_s12), en el que la relación glucosa/arabinosa es de 5,6. Esto podría explicarse si las cepas de bacterias y/o de levaduras empleadas tuvieran actividad glicosidasa, descrita por Ugliano y col., 2003 y Ugliano y col., 2006, puesto que es

posible que estas enzimas sean capaces de hidrolizar monosacáridos constituyentes de otro tipo de polisacárido. En esta muestra esa actividad sería más importante puesto que todos los resultados apuntan a que en ella la actividad autolítica es más intensa. La presencia de manosa en estos polisacáridos indica que proceden, al menos en parte, de las levaduras.

Tabla 3.1-8. Distribución molar (%) de los monosacáridos de los polisacáridos de la fracción F2 obtenida de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, de los vinos tintos estudiados.

	Vino inicial	Vino después de la FML		Vinos después de 12 meses en bodega		
	Vi	FML-D	FML-B	D-SL-E12	D-L-A _s 12	B-L-A _s 12
Arabinosa	44,0	21,8	29,6	34,0	29,6	12,0
Manosa	5,6	12,4	9,6	6,3	9,6	9,6
Ramnosa	4,3	10,9	5,3	2,8	5,3	4,6
Galactosa	2,7	8,4	7,0	3,1	7,0	3,5
Xilosa	1,5	3,1	4,0	3,1	4,0	3,7
Glucosa	41,9	43,4	44,5	50,7	44,5	66,7

3.1.1.4. Resumen de los principales resultados obtenidos del estudio de la fracción nitrogenada de los vinos tintos.

De los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que solo se produce una ligera reducción en el contenido de aminoácidos libres durante la FML. Este hecho se debe, probablemente, a la liberación de aminoácidos al vino por medio de la actividad proteásica de las bacterias ácido lácticas y de las proteasas de las levaduras. Durante el envejecimiento de los vinos con lías, se liberan aminoácidos por autólisis de levaduras y bacterias. Esta liberación de aminoácidos es más pronunciada en vinos envejecidos con lías y con agitación semanal. Por tanto, es necesario tomar precauciones cuando los vinos se envejecen con lías, puesto que el riesgo de formación de aminas biógenas se incrementa debido a la actividad descarboxilasa residual de las bacterias ácido lácticas responsables de la FML. Los resultados obtenidos indican que si se aplica este tipo de tecnología para la elaboración de vinos tintos, la cual incrementa la complejidad de los mismos, se necesita seleccionar una cepa de bacteria ácido láctica que no produzca aminas biógenas para asegurarnos que no se formen estas aminas.

Del estudio de la fracción peptídica de los vinos tintos se puede concluir que ésta es muy compleja, estando formada, al menos en parte, por glicopéptidos procedentes de las uvas y de las levaduras. Durante la fermentación maloláctica y el envejecimiento en barricas se producen cambios importantes, mayores en los vinos que envejecen con las lías. Debido a la importancia sensorial de los péptidos, es necesario tener este hecho en consideración por la repercusión que esta tecnología de elaboración puede tener en la calidad sensorial de los vinos. Según nuestro conocimiento, aunque los perfiles peptídicos y la composición han sido determinados anteriormente en vinos blancos, este es el primer estudio llevado a cabo sobre la fracción peptídica de los vinos tintos.

3.2. La fracción nitrogenada de vinos espumosos.

La D.O. Vinos de Madrid está interesada en potenciar la producción de vinos espumosos de las variedades Albillo y Malvar para incrementar la diversidad de los vinos que produce. Debido a la falta de estudios sobre los vinos espumosos de estas dos variedades se ha planteado esta investigación. Para llevarla a cabo, se han elaborado seis lotes de vinos espumosos a partir de dos vinos monovarietales de las variedades Albillo y Malvar, con tres cepas de levaduras, dos de ellas autóctonas de la D.O Vinos de Madrid, y una cepa comercial ampliamente utilizada en las bodegas para la elaboración de vinos espumosos por el método tradicional. Las cepas autóctonas habían sido seleccionadas en un estudio anterior por sus características floculantes (Fajardo y col., 2000) y pertenece al Banco de Levaduras del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA). Los detalles de la elaboración de estos vinos se muestran en el apartado 2.1.2. de materiales y métodos.

3.2.1. Influencia de la variedad de uva, de la segunda fermentación, de la cepa de levadura y del envejecimiento con las levaduras sobre los compuestos nitrogenados de vinos espumosos elaborados por el método tradicional.

3.2.1.1. Variación del nitrógeno total, del nitrógeno de alto peso molecular y de los aminoácidos libres.

Se ha llevado a cabo el análisis de la composición en nitrógeno total, en nitrógeno de alto peso molecular (HMWN) y en aminoácidos libres (mediante HPLC) en las muestras mencionadas en el apartado 2.1.2. de materiales y métodos, y los resultados obtenidos se muestran en las tablas 3.2-1 y 3.2-2 para los vinos de la variedad Albillo y Malvar, respectivamente. En los vinos blancos sí es posible estimar la concentración de compuestos nitrogenados de alto peso molecular, pues la concentración de los compuestos fenólicos que interfieren en el análisis es muy inferior con relación a los vinos tintos. La concentración de HMWN se ha calculado teniendo en cuenta el peso molecular de la BSA (proteína utilizada como patrón) y el número de nitrógenos que componen dicha molécula, como se ha indicado en el apartado 2.2.2. de materiales y métodos.

Como puede observarse, los vinos estudiados son muy diferentes en cuanto a su composición nitrogenada, presentando en todos los casos los vinos de la variedad Malvar una concentración mayor. El vino base de la variedad Albillo presenta una concentración de nitrógeno

total, 197,3 mg/L, muy parecida al valor medio, 180,0 mg/L, descrito por Cáceres y col. (1987), valor obtenido para 54 vinos blancos españoles de diferentes orígenes geográficos. Sin embargo, el vino base de la variedad Malvar presenta una concentración de nitrógeno total de 487,9 mg/L, valor muy superior al anterior, aunque dicho valor se encuentra comprendido dentro del intervalo de concentraciones encontrado por los autores anteriormente mencionados (valor máximo 966,0 mg/L). Durante la segunda fermentación el contenido en nitrógeno total disminuye en ambos casos y con todas las cepas ensayadas, mientras que durante el envejecimiento no se observan cambios importantes en los vinos de la variedad Albillo, excepto en el vino elaborado con la cepa 02, en el que se produce un incremento a los nueve meses y no se modifica posteriormente. En los vinos de la variedad Malvar, el envejecimiento da lugar a cambios mayores, incrementándose a los nueve meses el contenido en nitrógeno total en todos los vinos. La concentración de HMWN, por el contrario, es superior en el vino base de la variedad Albillo (2,4 mg/L) que en el vino base Malvar (1,4 mg/L).

En las tablas 3.2-1 y 3.2-2, también se muestran los contenidos en aminoácidos libres de estos vinos. La concentración total de los aminoácidos en el vino inicial de la variedad Albillo, 261,2 mg/L, también es menor que el valor encontrado en el vino base de la variedad Malvar, 1039,4 mg/L, pero ambos resultados se encuentran dentro del intervalo de concentración encontrado por Cáceres y col. (1986) al analizar 54 vinos blancos. Los aminoácidos mayoritarios en el vino base de la variedad Albillo estudiados son ácido glutámico, ácido aspártico, asparagina, glicina, arginina, α -alanina, ácido γ -aminobutírico, ácido α -aminobutírico, ornitina y lisina que están presentes en concentraciones comprendidas entre 10 y 30 mg/L. En los vinos de la variedad Malvar el aminoácido mayoritario es la arginina (294,5-494,8 mg/L), presentando también una concentración destacable, en el vino base, los mismos aminoácidos encontrados como mayoritarios en el caso del vino base de la variedad Albillo, junto con la glutamina, treonina, tirosina, fenilalanina y leucina, todos ellos con concentraciones comprendidas entre 10 y 109 mg/L, intervalo muy superior al encontrado en el vino base de la variedad Albillo. La suma de los aminoácidos libres disminuye o se mantiene constante durante la segunda fermentación, como consecuencia del consumo de los aminoácidos por parte de las levaduras. A los nueve y a los doce meses de envejecimiento se han detectado concentraciones menores, de la suma de aminoácidos, que al finalizar la segunda fermentación.

Está ampliamente demostrado que, durante el envejecimiento de los vinos espumosos con las levaduras, se produce una liberación de aminoácidos (Martínez-Rodríguez y col., 2002; Moreno-Arribas y col., 1996). También se ha comprobado que, en etapas avanzadas del

envejecimiento, se produce una disminución de éstos, para dar lugar, probablemente, a compuestos del aroma, como hemos visto en el caso del vino tinto estudiado en el apartado 3.1.1.1. Los resultados obtenidos, indican que en este caso ha predominado la transformación de aminoácidos en otros compuestos que la liberación.

Tabla 3.2-1. Nitrógeno total, HMWN y aminoácidos libres (mg/L) de los vinos de la variedad Albillo.

	VB	Cepa EC 1118			Cepa 01			Cepa 02		
		FF	9m	12m	FF	9m	12m	FF	9m	12m
Nitrógeno total	197,3	167,9	172,2	172,8	164,1	160,9	163,5	146,4	170,2	167,2
HMWN	2,4	2,7	2,7	3,4	3,0	2,8	3,1	2,8	2,8	3,4
Aminoácidos libres										
Asp	12,3	6,0	7,7	4,8	5,7	7,3	4,9	5,5	7,4	5,1
Glu	24,0	10,9	12,7	9,8	10,9	12,3	9,8	10,7	11,8	10,6
Asn	16,1	11,1	13,7	9,8	9,2	11,0	7,6	8,8	11,2	8,9
Ser	5,2	2,6	3,0	1,5	2,4	2,7	1,3	2,5	2,8	1,5
Gln	5,9	10,3	3,0	n.d.	8,1	3,0	n.d.	11,1	3,0	0,7
His	5,1	2,9	3,2	1,3	2,8	3,1	1,2	3,0	3,2	1,5
Gly	12,8	11,3	11,2	8,4	10,3	10,4	7,8	9,9	10,5	9,5
Thr	3,5	3,4	3,6	1,7	3,2	3,3	1,6	3,1	3,4	1,8
Arg	32,4	24,0	25,6	19,1	19,0	19,4	15,2	19,4	23,1	18,7
β -Ala	3,8	3,6	3,6	2,3	3,4	3,4	2,5	3,3	3,6	2,3
α -Ala	22,6	13,0	13,6	12,2	12,9	13,1	12,6	12,3	13,3	12,8
Gaba	26,5	26,2	24,2	24,0	23,7	21,3	22,1	22,2	21,1	24,5
Tyr	6,4	5,3	5,9	2,9	5,2	5,6	2,8	4,9	5,5	3,0
α -Aba	23,2	22,4	21,4	16,3	21,2	19,4	15,5	19,3	19,0	16,7
Met	3,8	2,6	2,8	0,5	2,6	2,8	0,5	2,6	2,7	0,6
Val	4,8	2,8	3,1	1,9	2,8	3,1	1,9	2,8	3,1	2,0
Trp	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phe	9,3	5,9	6,5	2,2	6,3	6,5	2,7	6,0	6,6	2,8
Ile	3,9	2,3	2,4	0,6	2,3	2,4	0,7	2,3	2,5	0,7
Leu	9,5	3,0	4,2	2,1	3,5	4,5	2,6	3,3	4,5	2,7
Orn	16,3	17,1	15,3	23,7	15,3	14,4	21,2	14,6	14,9	27,1
Lys	13,8	3,0	4,3	5,4	3,1	4,6	5,2	2,9	4,2	5,9
Suma de aminoácidos	261,2	189,7	191,0	150,5	173,9	173,6	139,7	170,5	177,4	159,4

n.d.= no detectado; Gaba: ácido γ -aminobutírico; α -Aba: ácido α -aminobutírico.

Con el fin de determinar si existe algún agrupamiento entre las muestras en función de las variables que se muestran en las tablas 3.2-1 y 3.2-2, se ha llevado a cabo el análisis de conglomerados, de forma semejante a la realizada en el apartado 3.1.1.2. y el resultado obtenido se muestra en la figura 3.2-1.

Como puede observarse, se obtienen dos grupos de muestras bien diferenciados, conteniendo cada uno de ellos las muestras de vino de una determinada variedad. El vino base de la variedad Albillo aparece separado de los demás vinos, mientras que el vino base de la variedad Malvar aparece junto a los vinos después de finalizar la segunda fermentación. Dentro de cada subgrupo, los vinos se agrupan en función del tiempo de envejecimiento, siendo los de la variedad Albillo, con 9 meses de envejecimiento con las levaduras, muy semejantes a sus correspondientes vinos después de la segunda fermentación.

Tabla 3.2-2. Nitrógeno total, HMWN y aminoácidos libres (mg/L) de los vinos de la variedad Malvar.

	VB	Cepa EC 1118			Cepa O1			Cepa O2		
		FF	9m	12m	FF	9m	12m	FF	9m	12m
Nitrógeno total	487,9	417,2	439,2	432,2	416,1	441,4	426,3	421,1	436,2	441,8
HMWN	1,4	1,3	3,4	2,7	1,3	3,2	2,5	1,3	3,2	2,4
Aminoácidos libres										
Asp	23,1	15,2	20,2	10,2	21,3	21,3	12,2	18,8	19,2	12,9
Glu	63,8	43,2	51,0	32,2	58,6	54,4	37,4	51,6	44,8	36,2
Asn	16,4	15,8	23,3	13,9	16,9	19,1	13,0	17,3	19,5	14,9
Ser	8,5	5,0	6,9	4,7	8,6	10,6	6,7	7,0	7,4	5,7
Gln	14,1	15,5	4,5	1,7	11,6	4,0	1,5	13,2	4,2	1,6
His	5,5	2,8	4,9	3,1	5,8	6,3	4,4	4,2	5,7	3,8
Gly	19,1	19,2	18,7	14,5	23,1	16,7	14,4	20,7	16,1	14,5
Thr	17,4	16,3	14,8	14,0	17,8	14,9	15,9	16,2	13,8	15,5
Arg	494,8	449,0	365,6	295,5	450,7	395,6	294,5	440,9	383,9	296,2
β -Ala	8,5	7,3	7,7	6,5	7,8	6,7	5,7	7,2	6,6	5,9
α -Ala	78,3	57,7	62,0	52,9	74,5	61,9	63,3	65,8	56,2	58,6
Gaba	109,3	100,5	101,1	100,4	105,7	82,0	98,1	99,9	78,6	97,9
Tyr	13,3	12,7	14,6	9,2	13,8	12,8	9,9	13,0	12,5	10,0
α -Aba	22,3	20,3	20,3	14,9	22,1	17,8	15,7	20,8	16,7	15,1
Met	7,8	3,9	4,8	2,3	6,3	6,2	4,2	5,2	4,9	3,1
Val	8,7	7,5	9,3	6,4	8,5	8,7	7,0	8,0	7,5	6,8
Trp	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phe	17,2	13,9	16,3	9,2	16,2	15,1	10,8	15,0	14,0	9,6
Ile	6,5	4,6	5,8	3,1	6,0	6,0	4,1	5,4	5,2	3,6
Leu	24,1	14,0	18,0	12,9	19,0	18,1	15,6	15,9	15,5	13,7
Orn	47,4	43,1	41,4	65,9	47,3	39,2	70,6	45,8	35,6	68,5
Lys	33,3	17,3	24,8	29,8	27,5	28,3	35,6	24,4	24,2	31,9
Suma de aminoácidos	1039,4	884,8	836,0	703,3	969,1	845,7	740,6	916,3	792,1	726,0

n.d.= no detectado; Gaba: ácido γ -aminobutírico; α -Aba: ácido α -aminobutírico.

Con el fin de comprobar que variables manifiestan mejor la relación entre los compuestos nitrogenados analizados en los vinos espumosos, se ha aplicado el análisis de componentes principales (CP). La primera componente principal explica el 79,7 % de la varianza total y la segunda componente principal el 10,8 % de la varianza total, que sumados supone el 90,5 %. La primera componente principal está altamente correlacionada y negativamente con todas las

variables estudiadas en este apartado (tabla 3.2-1 y 3.2-2), excepto con el HMWN, el ácido glutámico y el ácido α -aminobutírico, mientras que la segunda componente principal está correlacionada positivamente con el ácido glutámico y el ácido α -aminobutírico.

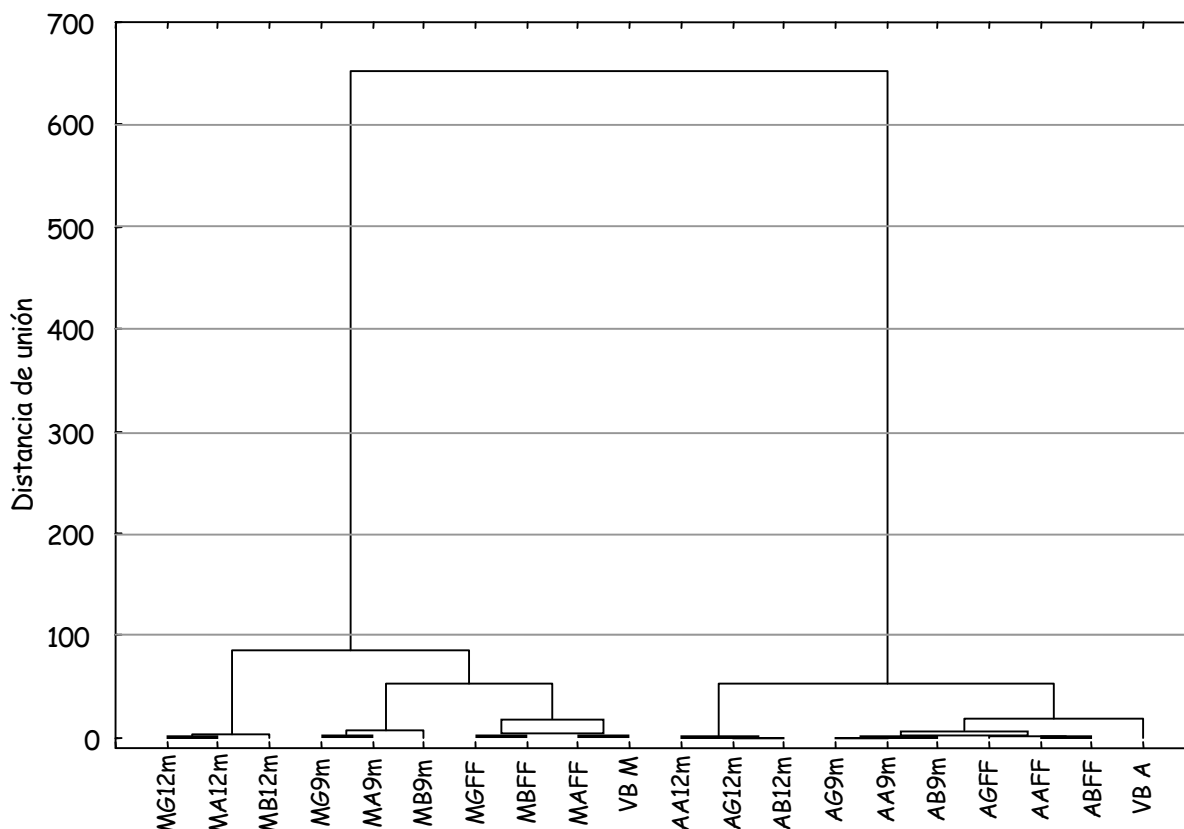


Figura 3.2-1. Dendrograma de las muestras de vinos espumosos estudiados, en función de los datos de nitrógeno total, aminoácidos libres, compuestos HMWN, variedad de uva (Malvar (M) y Albillo (A)) y cepa de levadura (EC1118 (B), cepa 01 (A) y cepa 02 (G)).

En la figura 3.2-2 se representan las muestras de vino estudiadas, en el plano formado por la primera componente principal (CP1) y la segunda componente principal (CP2). Como puede observarse, existe una gran separación entre las muestras de la variedad Malvar y Albillo, presentando las de la variedad Albillo valores positivos para la CP1, es decir, valores bajos para las variables que están correlacionadas con dicha CP y las de la variedad Malvar valores

negativos para dicha componente principal, con lo cual estas muestras tienen valores altos de las variables que están correlacionadas con dicha CP. También puede observarse en la figura que la CP2 permite diferenciar las muestras en función del tiempo de envejecimiento, situándose las muestras con 9 meses de envejecimiento de la variedad Malvar y las muestras con 12 meses de ambas variedades de uva estudiadas en la zona negativa de dicha CP. Por lo tanto, dichas muestras tienen valores bajos de ácido glutámico y ácido α -aminobutírico, mientras que el resto de muestras estudiadas presentan valores altos para estas dos variables. Esta distribución de muestras es semejante a la obtenida mediante el análisis de conglomerados. No se ha obtenido una diferenciación de las muestras en función de la cepa de levadura empleada con ninguno de los dos tratamientos estadísticos aplicados.

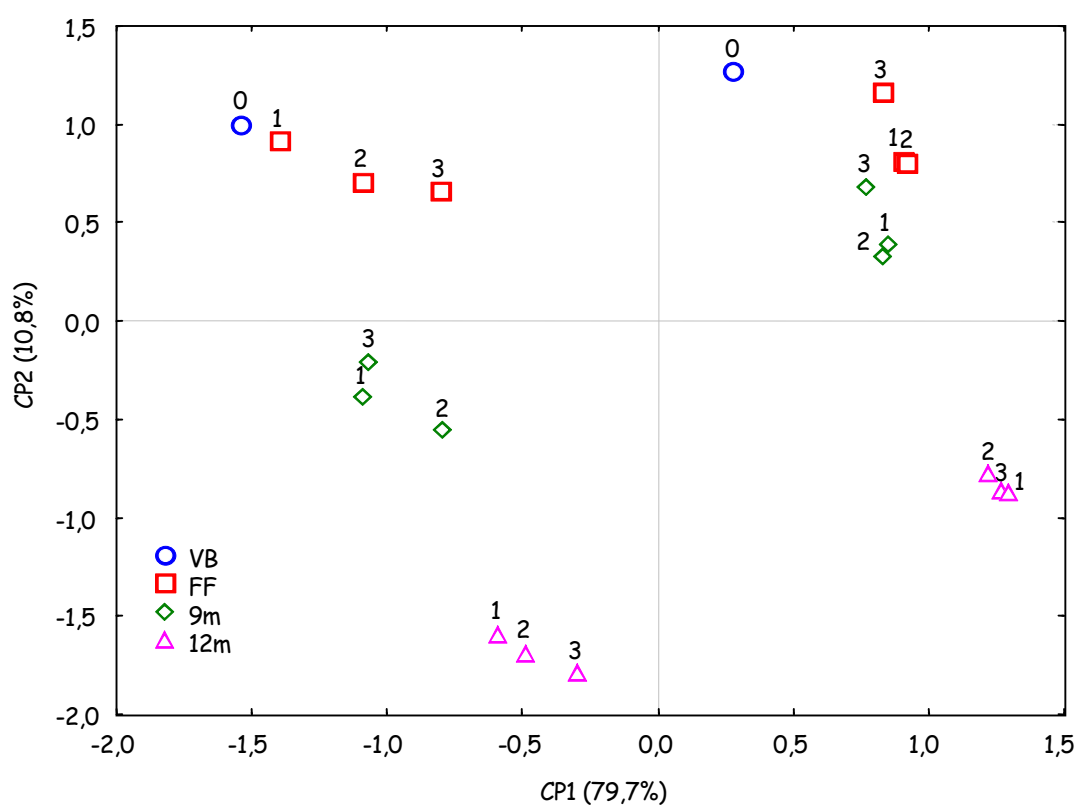


Figura 3.2-2. Representación de las muestras de vinos, en el plano definido por las dos primeras componentes principales. 1=Cepa O1, 2=Cepa O2 y 3=Cepa EC1118. Las muestras situadas en la zona de valores negativos de la CP1 pertenecen a vinos de la variedad Malvar y en la zona positiva a vinos de la variedad Albillo.

Para comprobar los efectos producidos por los factores tiempo de envejecimiento y cepa de levadura sobre la composición nitrogenada de los vinos espumosos, se ha realizado el análisis de la varianza de dos vías y, posteriormente, para aquellos factores cuyas medias resultaron significativamente diferentes, se ha aplicado el test de Fisher-LSD para conocer las diferencias existentes, dando lugar ambos análisis a los mismos resultados, los cuales se muestran en las tablas 3.2-3 y 3.2-4. El análisis de la varianza se ha llevado a cabo procesando los datos de los vinos de las dos variedades de uva estudiadas por separado, ya que como ha quedado demostrado con los dos tratamientos estadísticos anteriores, los dos grupos de muestras son muy diferentes y el análisis de la varianza en función de la variedad de uva dio como resultado que todas las variables estudiadas resultaron significativamente diferentes en los dos grupos de vinos, con la excepción del ácido glutámico y el ácido α -aminobutírico. Estas variables eran las que no estaban correlacionadas con la primera componente principal (componente que agrupa las muestras en función de la variedad) en el tratamiento estadístico anterior. Hay que indicar que en el análisis de la varianza no se ha podido tener en cuenta los vinos base, pues tan solo es una muestra para cada grupo de muestras estudiadas.

Como puede comprobarse en las tablas 3.2-3 y 3.2-4, todas las variables estudiadas en este apartado han resultado significativamente diferentes en función del tiempo, con la excepción del nitrógeno total, la β -alanina y el ácido γ -aminobutírico en los dos grupos de muestras estudiados y, además, la leucina en el caso de los vinos de la variedad Malvar. La cepa de levadura con la que se ha realizado la segunda fermentación, sin embargo, influye en muy pocas de las variables estudiadas. En el caso de los vinos de la variedad Albillo la cepa de levadura influye en la asparagina, serina, histidina, arginina y leucina, siendo el comportamiento de las tres cepas estudiadas similar para estas variables significativamente diferentes (tabla 3.2-3; figura 3.2-3). En el caso de los vinos de la variedad Malvar las variables significativamente diferentes han resultado ser la serina, histidina, metionina y lisina, en este caso siempre la cepa 01 ha dado lugar a valores mayores de estas variables en relación a las otras dos cepas estudiadas (tabla 3.2-4; figura 3.2-4). La cepa comercial EC1118 siempre da lugar a concentraciones de esas variables menores o iguales a los que se han obtenido con la cepa 02. En casi todos los casos, los valores mayores se obtuvieron a los nueve meses de envejecimiento, tanto en los vinos espumosos de la variedad Albillo, como en los de la variedad Malvar.

Hay que tener en cuenta que las cepas de levaduras utilizadas han sido, previamente, seleccionadas y, por tanto, pueden ser muy semejantes entre si, lo que puede ser la causa de las pocas diferencias encontradas en función de la cepa.

Tabla 3.2-3. Efectos de los factores, media \pm desviación standard e intervalo de concentración (mg/L) de las variables estudiadas de los vinos espumosos de la variedad de uva Albillo.

	Efectos Factores		Media \pm SD	Intervalo	Orden ^a	
	Tiempo	Cepa			Tiempo	Cepa
Nitrógeno total	n.s.	n.s.	165,0 \pm 8,0	146,4-172,8	--	--
HMWN	*	n.s.	3,0 \pm 0,3	2,7-3,4	12m>9m=FF	--
Aminoácidos libres						
Asp	*	n.s.	6,0 \pm 1,1	4,8-7,7	12m<FF<9m	--
Glu	*	n.s.	11,1 \pm 1,0	9,8-12,7	12m=FF<9m	--
Asn	*	*	10,1 \pm 1,8	7,6-13,7	12m=FF<9m	EC1118>02>01
Ser	*	*	2,3 \pm 0,6	1,3-3,0	12m<FF<9m	01<02=EC1118
Gln	*	n.s.	4,4 \pm 4,4	0,0-11,1	12m<9m<FF	--
His	*	*	2,5 \pm 0,9	1,2-3,2	12m<FF<9m	01 \leq EC1118 \leq 02
Gly	*	n.s.	9,9 \pm 1,2	7,8-11,3	12m<FF=9m	--
Thr	*	n.s.	2,8 \pm 0,8	1,6-3,6	12m<FF=9m	--
Arg	*	*	20,4 \pm 3,2	15,2-25,6	12m<FF=9m	01 \leq 02 \leq EC1118
β -Ala	n.s.	n.s.	3,1 \pm 0,5	2,3-3,6	--	--
α -Ala	*	n.s.	12,9 \pm 0,5	12,2-13,6	12m<FF=9m	--
Gaba	n.s.	n.s.	23,3 \pm 1,7	21,1-26,2	--	--
Tyr	*	n.s.	4,6 \pm 1,3	2,8-5,9	12m<FF<9m	--
α -Aba	*	n.s.	19,0 \pm 2,4	15,5-22,4	12m<FF=9m	--
Met	*	n.s.	2,0 \pm 1,1	0,5-2,8	12m<FF<9m	--
Val	*	n.s.	2,6 \pm 0,5	1,9-3,1	12m<FF<9m	--
Trp	--	--	n.d.	n.d.	--	--
Phe	*	n.s.	5,1 \pm 1,9	2,2-6,6	12m<FF<9m	--
Ile	*	n.s.	1,8 \pm 0,9	0,6-2,5	12m<FF<9m	--
Leu	*	*	3,4 \pm 0,9	2,1-4,5	12m<FF<9m	EC1118<02=01
Orn	*	n.s.	18,2 \pm 4,7	14,4-27,1	12m>FF=9m	--
Lys	*	n.s.	4,3 \pm 1,1	2,9-5,9	12m>9m>FF	--
Suma de aminoácidos	*	n.s.	169,5 \pm 17,0	139,7-191,0	12m<FF=9m	--

Diferencias significativas * $p < 0,05$; n.s. (no existen diferencias significativas); n.d.= no detectado; Gaba: ácido γ -aminobutírico; α -Aba: ácido α -aminobutírico. ^a Orden de los valores medios de los niveles de los factores según el test de Fisher-LSD

Tabla 3.2-4. Efectos de los factores, media \pm desviación standard e intervalo de concentración (mg/L) de las variables estudiadas de los vinos espumosos de la variedad de uva Malvar.

	Efectos Factores		Media \pm SD	Intervalo	Orden ^a	
	Tiempo	Cepa			Tiempo	Cepa
Nitrógeno total	n.s.	n.s.	430,2 \pm 14,9	416,1-441,8	--	--
HMWN	*	n.s.	2,4 \pm 0,9	1,3-3,4	FF<12m<9m	--
Aminoácidos libres						
Asp	*	n.s.	16,8 \pm 4,2	10,2-21,3	12m<9m=FF	--
Glu	*	n.s.	45,5 \pm 9,0	32,2-58,6	12m<9m=FF	--
Asn	*	n.s.	17,1 \pm 3,2	13,0-23,3	9m>12m=FF	--
Ser	*	*	7,0 \pm 1,8	4,7-10,6	12m \leq FF \leq 9m	01>02=EC1118
Gln	*	n.s.	6,4 \pm 5,5	1,5-15,5	12m<9m=FF	--
His	*	*	4,6 \pm 1,2	2,8-6,3	12m=FF<9m	EC1118<02<01
Gly	*	n.s.	17,5 \pm 3,1	14,4-23,1	FF>12m=9m	--
Thr	*	n.s.	15,5 \pm 1,3	13,8-17,8	FF>12m=9m	--
Arg	*	n.s.	374,7 \pm 66,3	294,5-450,7	12m<9m=FF	--
β -Ala	n.s.	n.s.	6,8 \pm 0,7	5,7-7,8	--	--
α -Ala	*	n.s.	61,4 \pm 6,3	52,9-74,5	12m<9m=FF	--
Gaba	n.s.	n.s.	96,0 \pm 9,2	78,6-105,7	--	--
Tyr	*	n.s.	12,1 \pm 1,9	9,2-14,6	12m<9m=FF	--
α -Aba	*	n.s.	18,2 \pm 2,7	14,9-22,1	12m<9m=FF	--
Met	*	*	4,5 \pm 1,3	2,3-6,3	12m<9m=FF	EC1118<02<01
Val	*	n.s.	7,7 \pm 1,0	6,4-9,3	12m<FF<9m	--
Trp	--	--	n.d.	n.d.	--	--
Phe	*	n.s.	13,3 \pm 2,8	9,2-16,3	12m<9m=FF	--
Ile	*	n.s.	4,9 \pm 1,1	3,1-6,0	12m<9m=FF	--
Leu	n.s.	n.s.	15,9 \pm 2,1	12,9-19,0	--	--
Orn	*	n.s.	50,8 \pm 13,6	35,6-70,6	9m<FF<12m	--
Lys	*	*	27,1 \pm 5,3	17,3-35,6	12m>9m=FF	EC1118 \leq 02 \leq 01
Suma de aminoácidos	*	n.s.	823,8 \pm 90,9	703,3-969,1	12m<9m<FF	--

Diferencias significativas * $p<0,05$; n.s. (no existen diferencias significativas); n.d.= no detectado; Gaba: ácido γ -aminobutírico; α -Aba: ácido α -aminobutírico. ^a Orden de los valores medios de los niveles de los factores según el test de Fisher-LSD

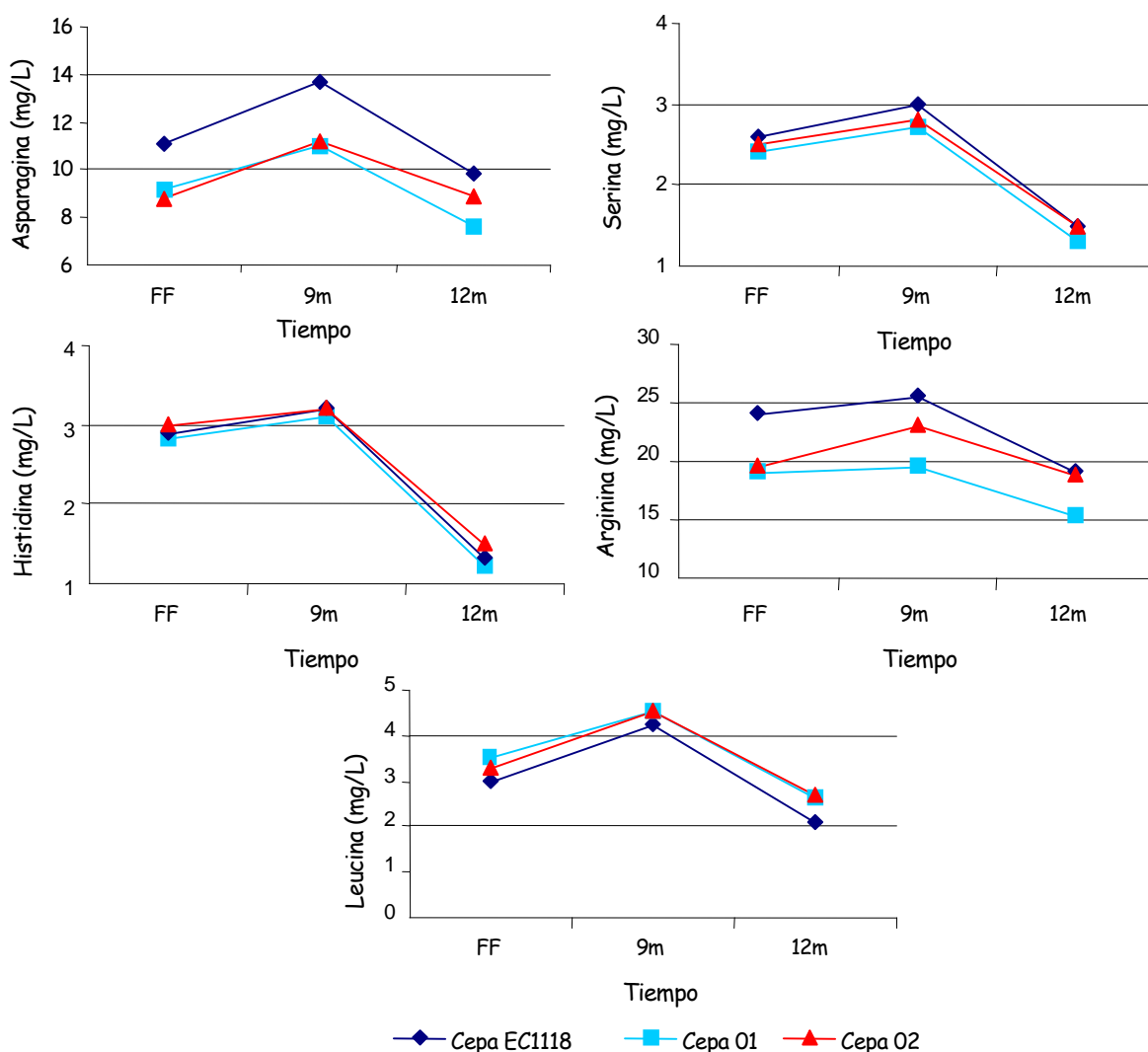


Figura 3.2-3. Evolución de los aminoácidos libres, de los vinos espumosos de la variedad Albillo, significativamente diferentes según el test de Student-Newman-Keul, en función de la cepa de levadura.

En cuanto a la evolución de las variables estudiadas significativamente diferentes en función del tiempo de envejecimiento con las levaduras, se puede destacar que después de la segunda fermentación hasta los 9 meses de envejecimiento con las levaduras en todos los casos se observa un aumento de la concentración o los valores permanecen iguales, indicando que se está produciendo la autólisis de las levaduras. En el caso de los vinos de la variedad Malvar para la glutamina, glicina, treonina, arginina y la suma de aminoácidos el efecto es el contrario.

De los 9 a los 12 meses de envejecimiento con las levaduras, en casi todos los casos, se ha obtenido que las concentraciones disminuyen, con la excepción del nitrógeno HMWN, la ornitina y la lisina que aumentan en el caso de los vinos de la variedad Albillo y con la excepción de la asparagina, la glicina, la treonina, la ornitina y la lisina en el caso de los vinos de la variedad Malvar. Este último aminoácido aumenta, también, durante este periodo en un estudio realizado por Martínez-Rodríguez y col. (2002). La disminución de aminoácidos puede ser debida, como se ha comentado anteriormente, a reacciones de descarboxilación de los aminoácidos o a la formación de ésteres (Martínez-Rodríguez y col., 2002). Esta disminución puede ocurrir a diferentes tiempos, puesto que está descrito que las distintas etapas durante la elaboración de los vinos espumosos no se alcanzan a los mismos tiempos.

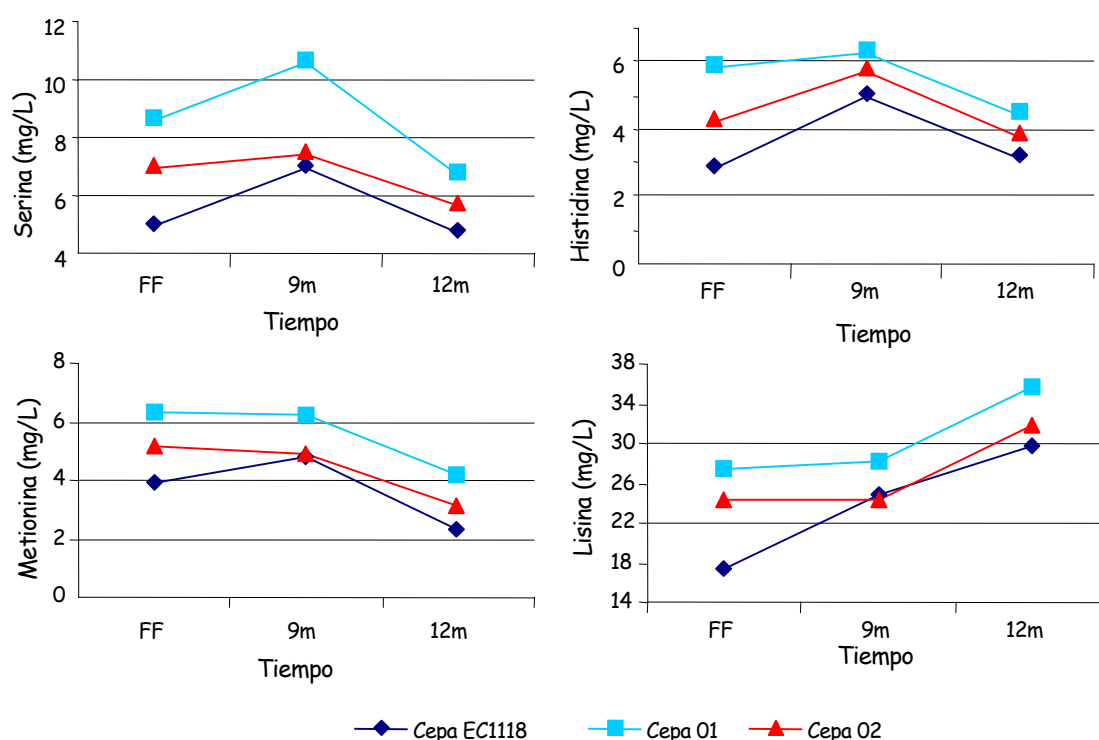


Figura 3.2-4. Evolución de los aminoácidos libres, de los vinos espumosos de la variedad Malvar, significativamente diferentes según el test de Student-Newman-Keul, en función de la cepa de levadura.

3.2.1.2. Variación de la fracción peptídica durante la segunda fermentación y el envejecimiento con las levaduras.

Como en el caso de los vinos de la variedad Tempranillo y debido a la complejidad del análisis de los péptidos, no se ha podido realizar el estudio de todas las muestras. Por ello, se ha seleccionado el vino base de la variedad Malvar, la más apreciada de las dos variedades estudiadas de la Denominación de Origen Vinos de Madrid para la elaboración de vinos espumosos y los vinos espumosos elaborados con la cepa comercial EC1118, por ser la cepa que se ha considerado control.

En este caso, al igual que en el estudio de la fracción nitrogenada de los vinos tintos, el nitrógeno peptídico de las muestras estudiadas se ha calculado restando al nitrógeno total el nitrógeno amínico y, en este caso, también el nitrógeno correspondiente a los compuestos de alto peso molecular (HMWN), aunque éste es, prácticamente, despreciable con relación al nitrógeno amínico y peptídico, como se indicó en el estudio de los vinos tintos.

En la figura 3.2-5 se muestra la concentración de las distintas fracciones nitrogenadas en el vino base (VB), en el vino después de la segunda fermentación (FF) y en los vinos a los 9 y 12 meses de envejecimiento con las levaduras (9m y 12m, respectivamente). Se puede observar que se produce una disminución del nitrógeno peptídico durante la segunda fermentación, como ocurría con los vinos tintos estudiados anteriormente. Durante los primeros nueve meses de envejecimiento en botella con la lías, aumentó el contenido de nitrógeno peptídico de los vinos. Durante los nueve y los doce meses de envejecimiento se produce un descenso en el contenido de nitrógeno peptídico en la cepa comercial y en la cepa 01, aumentando el contenido de la cepa 02, lo cual indica que la autólisis no ha terminado para esta última cepa. Se puede destacar que el comportamiento de las tres cepas durante el proceso de elaboración es similar en todas las fracciones estudiadas.

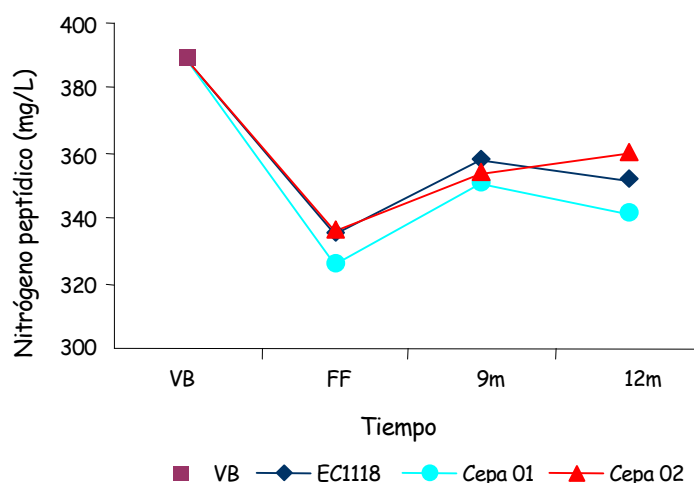


Figura 3.2-5. Concentración de nitrógeno peptídico en el vino base (VB) y en los vinos espumosos FF, 9m y 12m, de la variedad Malvar.

3.2.1.2.a. Fraccionamiento de los péptidos.

El fraccionamiento de los péptidos se ha llevado a cabo siguiendo la misma metodología que se ha empleado para fraccionar los péptidos del vino tinto, descrita anteriormente en el apartado 3.1.1.3.a.

3.2.1.2.b. Evolución y composición de los péptidos más polares.

En la figura 3.2-6 se muestra el perfil peptídico de la fracción 1, obtenido por HPLC, a modo de ejemplo, de uno de los vinos estudiados. Al igual que en los vinos tintos, el cromatograma se ha subdividido en tres zonas, siendo la zona que se ha tenido en cuenta en este estudio, la zona intermedia (zona II), cuyo tiempo de retención está comprendido entre el minuto 5 y el 14. Los picos más importantes dentro de dicha zona han sido numerados.

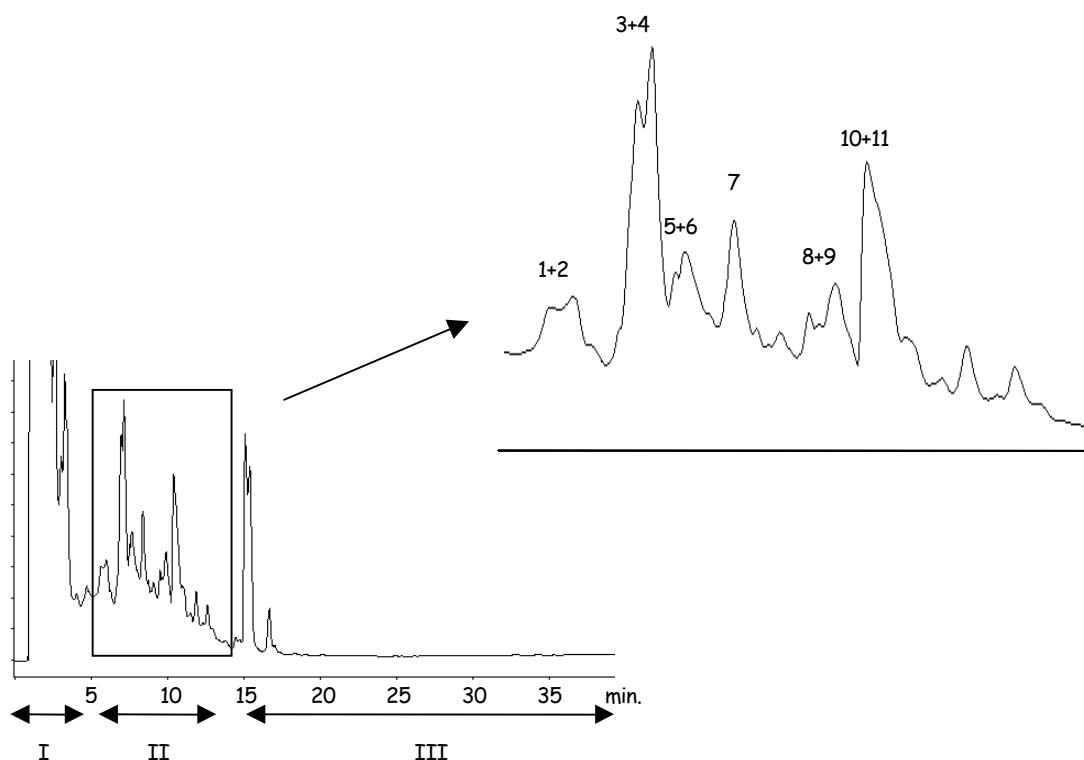


Figura 3.2-6. Cromatograma de RP-HPLC de la fracción F1 del vino espumoso de la variedad Malvar, eluida con agua en la columna de Cosmosil 140 C₁₈-OPN. I = aminoácidos libres + péptidos. II = Péptidos. III= Compuestos fenólicos + péptidos. La zona II ha sido ampliada.

En la tabla 3.2-5 se muestran las áreas de los picos detectados en la zona II de la fracción 1 de todos los vinos estudiados, así como la suma de las áreas. En dicha fracción se han obtenido un total de 11 picos mayoritarios, de los cuales solo el pico #7 aparece totalmente resuelto del resto de los picos, los demás coeluyen dos a dos y, por tanto, se han integrado conjuntamente. En todas las muestras aparecen los mismos picos. Los picos mayoritarios correspondientes a los péptidos más polares, en todos los vinos estudiados, han resultado ser los picos #3+4 y #10+11. Todos los picos y su suma disminuyen ligeramente durante la segunda fermentación (de 3951 a 3194), debido a su consumo por las levaduras, ya que éstas hidrolizan los péptidos para obtener compuestos nitrogenados fácilmente asimilables, de forma análoga a lo que ocurría con las bacterias durante la fermentación maloláctica. Todos los picos, excepto los

#5+6 y #7, aumentan durante el envejecimiento con las levaduras, alcanzando a los 12 meses valores semejantes a los encontrados en el vino base.

Tabla 3.2-5. Áreas de los picos obtenidos en la fracción F1 (zona II) del vino base (VB) y de los vinos espumosos FF, 9m y 12m.

Número del pico*	VB	FF	9m	12m
1+2	472	422	540	600
3+4	1336	1039	1140	1303
5+6	253	208	155	181
7	345	271	257	250
8+9	426	380	432	408
10+11	1119	874	1110	1148
Suma de áreas	3951	3194	3634	3890

* Para la identidad de los picos, ver la figura 3.2-6

La composición aminoacídica de los péptidos más polares del vino base y vinos espumosos estudiados se ha determinado de forma análoga al vino tinto, según se comenta en el apartado 3.1.1.3.b. La distribución molar de los aminoácidos de los péptidos de esta fracción se muestra en la tabla 3.2-6. Los aminoácidos mayoritarios de los péptidos más polares del vino base son ácido glutámico y/o glutamina, glicina, arginina, α -alanina, ácido γ -aminobutírico, ornitina y lisina, los cuales representan casi el 79% del total de los aminoácidos de la fracción 1. La mayoría de estos aminoácidos aparecen como mayoritarios en otros estudios realizados sobre vinos espumosos (Moreno-Arribas y col., 1998a) y, también en los vinos tintos estudiados en el apartado 3.1.1.3. Otros aminoácidos detectados han sido ácido aspártico y/o asparagina, serina, histidina, β -alanina, tirosina, ácido α -aminobutírico, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina y leucina. En los vinos al finalizar la segunda fermentación, la distribución de los aminoácidos mayoritarios es similar a la del vino base, presentando en este caso la excepción de arginina, ácido γ -aminobutírico y ornitina, llegando estos dos últimos a desaparecer. Hay que destacar el gran incremento de glicina que se produce durante esta etapa.

Tabla 3.2-6. Distribución molar (%) de los aminoácidos de los péptidos de la fracción F1 obtenida de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, del vino base (VB) y de los vinos espumosos FF, 9m y 12m.

	VB	FF	9m	12m
Asx	2,1	2,4	2,2	1,9
Glx	9,6	12,3	10,9	8,6
Ser	4,5	4,5	4,8	5,2
His	1,8	2,1	2,1	2,6
Gly	19,1	29,2	25,7	27,8
Thr	n.d.	1,3	0,3	2,8
Arg	8,1	2,1	6,4	6,6
β-Ala	0,7	0,8	0,2	0,6
α-Ala	11,2	9,7	9,0	10,0
Gaba	10,6	n.d.	1,7	n.d.
Tyr	1,1	1,4	2,8	1,1
α-Aba	3,1	6,6	4,7	5,9
Met	0,4	0,2	0,3	0,5
Val	3,2	6,0	5,9	7,3
Phe	0,5	0,1	0,4	n.d.
Ile	1,2	1,7	1,4	1,2
Leu	2,8	3,3	2,9	2,9
Orn	7,8	n.d.	2,1	n.d.
Lys	12,1	16,4	16,2	15,0

n.d. = no detectado; Gaba: ácido γ-aminobutírico; α-Aba: ácido α-aminobutírico.

Durante el envejecimiento no se producen grandes cambios en el contenido de aminoácidos, permaneciendo como mayoritarios los aminoácidos ácido glutámico y/o glutamina, glicina, α-alanina y lisina, aunque presentan valores ligeramente más bajos que los del vino tras la segunda fermentación. Por otro lado, el cambio más significativo es el ligero incremento de la arginina a los nueve meses de envejecimiento, permaneciendo, posteriormente, constante.

3.2.1.2.c. Evolución y composición de los péptidos menos polares.

En la figura 3.2-7 se muestra, también a modo de ejemplo, el cromatograma obtenido por HPLC de los péptidos menos polares (fracción 2). También, en este caso, se han enumerado los picos mayoritarios obtenidos. En la tabla 3.2-7 se muestran las áreas de los picos obtenidos para todas las muestras estudiadas, así como el área total para cada una de ellas. En este caso se

han obtenido un total de 8 picos, obteniéndose mejor resolución cromatográfica para los mismos, con relación a la obtenida para la fracción 1 de las mismas muestras. Tan sólo los picos #3 y #4 no se resuelven bien y se han integrado conjuntamente. En este caso también se han detectado todos los picos a lo largo de todo el proceso de elaboración del vino espumoso. Los picos mayoritarios en esta fracción han resultado ser los picos #3+4 y el #8. Durante la segunda fermentación se produce una disminución de las áreas totales, manteniéndose constante en el envejecimiento. Esto se debe, al igual que ocurría en los vinos tintos, a que los péptidos de mayor peso molecular (menos polares), se hidrolizan durante el envejecimiento para dar lugar a péptidos de menor peso molecular, justificándose de esta manera el incremento observado en la fracción F1, descrito anteriormente.

Las áreas de los picos detectados en la fracción F2 y su suma, son del mismo orden que las de los picos de la fracción F1. En el vino después de la segunda fermentación se detectan los mismos picos pero su concentración es inferior que en el vino base. Durante el envejecimiento con las levaduras no se han observado modificaciones importantes de la intensidad de los picos. Durante el proceso de envejecimiento de los vinos espumosos con las levaduras, se produce de forma sucesiva la liberación de aminoácidos y de péptidos y su consumo y/o hidrólisis (Martínez-Rodríguez y col., 2002; Moreno-Arribas y col., 1996). Hay que suponer que los péptidos cuya intensidad se ha incrementado en la fracción F1 proceden de los péptidos de mayor tamaño detectados en la fracción F2, y estos a su vez de proteínas o polipéptidos. Esto justifica que en un momento dado puedan observarse cambios en una fracción y no detectarse en otras.

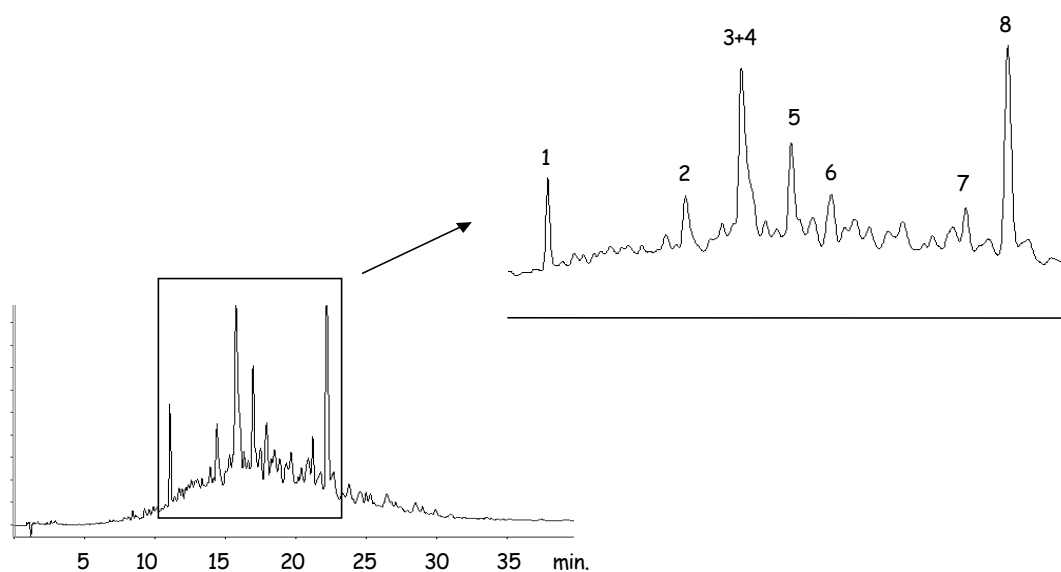


Figura 3.2-7. Cromatograma de RP-HPLC de la fracción F2, del vino espumoso de la variedad Malvar, eluida con etanol al 10% de la columna de Cosmosil 140 C₁₈-OPN. La zona de interés ha sido ampliada.

Tabla 3.2-7. Áreas de los picos obtenidos en la fracción F2 del vino base (VB) y de los vinos espumosos FF, 9m y 12m.

Número del pico*	VB	FF	9m	12m
1	313	320	324	318
2	335	235	223	237
3+4	1220	901	854	674
5	478	458	516	421
6	291	91	110	102
7	269	300	372	347
8	1083	914	898	925
Suma de áreas	3989	3219	3297	3024

* Para la identidad de los picos, ver la figura 3.2-7

Al igual que con la fracción más polar, se ha realizado el análisis de los aminoácidos de los péptidos menos polares (fracción F2) y los resultados se muestran en la tabla 3.2-8. En el vino base los aminoácidos que se encuentran en mayor proporción son ácido glutámico y/o glutamina, valina y leucina, encontrándose en una proporción un poco más baja los aminoácidos ácido aspártico y/o asparagina, serina, glicina, treonina, α -alanina e isoleucina, representando todos ellos el 85% del total de los aminoácidos de los péptidos, de los cuales, la mayor proporción la componen los aminoácidos apolares glicina, α -alanina, valina, isoleucina y leucina. También han sido detectados los aminoácidos histidina, arginina, β -alanina, tirosina, metionina, fenilalanina y lisina. Durante la segunda fermentación se observa un gran aumento de la glicina, siendo éste más pequeño para el ácido glutámico y/o glutamina. Por el contrario, la treonina y la lisina son los aminoácidos que más disminuyen.

Tabla 3.2-8. Distribución molar (%) de los aminoácidos de los péptidos de la fracción F2 obtenida de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, del vino base (VB) y de los vinos espumosos FF, 9m y 12m.

	VB	FF	9m	12m
Asx	9,7	8,8	7,6	9,3
Glx	13,2	16,2	4,3	11,1
Ser	6,9	7,3	8,4	8,1
His	0,6	n.d.	0,3	0,2
Gly	6,9	14,7	17,7	16,7
Thr	7,7	3,9	5,7	6,1
Arg	2,1	1,7	1,5	1,2
β -Ala	0,3	n.d.	n.d.	n.d.
α -Ala	8,1	7,9	8,4	8,2
Gaba	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tyr	4,4	4,2	5,1	4,3
α -Aba	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Met	0,8	1,0	1,4	1,3
Val	12,2	11,2	12,4	10,0
Phe	3,9	3,5	4,0	3,5
Ile	8,8	8,5	9,9	7,8
Leu	11,5	10,5	12,7	11,0
Orn	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lys	2,8	0,6	0,7	1,0

n.d. = no detectado; Gaba: ácido γ -aminobutírico; α -Aba: ácido α -aminobutírico.

Durante el envejecimiento no se producen cambios importantes, siendo lo más destacable la disminución del ácido glutámico y/o glutamina a los nueve meses del mismo, aumentando de nuevo con posterioridad.

3.2.1.2.d. Composición en monosacáridos de los polisacáridos de las fracciones peptídicas.

De forma semejante al estudio llevado a cabo en los vinos tintos, se ha realizado el estudio de la composición en monosacáridos de los polisacáridos constituyentes del vino base y de los vinos espumosos estudiados y los resultados se muestran en la tabla 3.2-9, para la fracción F1 y en la tabla 3.2-10 para la fracción F2 en forma de distribución molar.

Tabla 3.2-9. Distribución molar (%) de los monosacáridos de los polisacáridos de la fracción F1 obtenida de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, del vino base (VB) y de los vinos espumosos FF, 9m y 12m.

% molar	VB	FF	9m	12m
Arabinosa	10,4	16,0	16,9	13,9
Manosa	10,0	18,4	10,0	2,4
Ramnosa	2,6	n.d.	2,6	4,6
Galactosa	4,7	n.d.	9,4	9,6
Xilosa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glucosa	72,3	65,6	61,1	69,5

n.d.: no detectado.

La distribución de los monosacáridos de los polisacáridos de la fracción F1 de estos vinos es algo diferente de la de los polisacáridos de esta misma fracción de los vinos tintos ya que tienen manosa y en cambio no se ha detectado xilosa en ninguna de las muestras. El azúcar mayoritario, como en el caso del vino tinto, es la glucosa, de 61,1 a 72,3 %, seguida también de la arabinosa. Durante el envejecimiento aumenta la galactosa, debido, probablemente, a la liberación de glicopéptidos procedentes de glicoproteínas de la uva y, por el contrario, disminuye la manosa porque puede que los glicopéptidos procedentes de las levaduras se hayan

hidrolizado para dar lugar a aminoácidos o exista en el medio glicosidasas que actúen hidrolizando prioritariamente a la manosa.

En la fracción F2 se han detectado los monosacáridos arabinosa, manosa, ramnosa, galactosa, xilosa y glucosa, siendo el azúcar mayoritario, como en la fracción F1, la glucosa (55,4-68,3%), disminuyendo este porcentaje a lo largo del proceso de elaboración. La manosa es el segundo azúcar en orden de importancia en esta fracción. Su porcentaje se mantiene prácticamente constante hasta los 9 meses de envejecimiento (17,1% de media) y aumenta hasta constituir el 26,1% de los azúcares de los polisacáridos a los 12 meses de envejecimiento. La presencia de manosa en estos polisacáridos indica que proceden, al menos en parte, como en el caso de los polisacáridos de la fracción F2 del vino tinto (Tabla 3.1-8) de las levaduras.

Tabla 3.2-10. Distribución molar (%) de los monosacáridos de los polisacáridos de la fracción F2 obtenida de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, del vino base (VB) y de los vinos espumosos FF, 9m y 12m.

% molar	VB	FF	9m	12m
Arabinosa	4,3	2,7	3,0	3,8
Manosa	17,2	17,1	17,0	26,1
Ramnosa	3,9	2,9	2,2	3,7
Galactosa	6,2	4,7	6,7	7,0
Xilosa	5,2	4,3	3,8	4,0
Glucosa	63,2	68,3	67,3	55,4

No existen estudios sobre estas fracciones en la literatura por lo que no se pueden comparar estos resultados con los obtenidos por otros autores. Pueyo y col. (1995), en el estudio de la composición en monosacáridos de los polisacáridos neutros de mostos, vinos y cavas completos, es decir, sin fraccionar, elaborados con variedades de uvas blancas, han obtenido, a pesar de que estamos comparando vinos completos con fracciones aisladas, resultados semejantes a los nuestros en cuanto a la distribución de los diferentes monosacáridos, sin embargo, estos autores no encuentran glucosa en los polisacáridos de los vinos y de los cavas, aunque si en los mostos. Los polisacáridos constituidos por glucosa son hidrolizados durante la

fermentación alcohólica y los monosacáridos liberados consumidos por las levaduras. Que la glucosa sea el monosacárido más abundante encontrado en las fracciones estudiadas es un dato más que nos indica que los polisacáridos deben estar unidos a los péptidos y no se encuentran en forma libre y quizás por ello no son hidrolizados tan fácilmente durante la fermentación alcohólica.

3.2.1.3. Resumen de los principales resultados obtenidos del estudio de la fracción nitrogenada de vinos espumosos.

Los resultados obtenidos del estudio de vinos espumosos elaborados con las variedades Albillo y Malvar y con tres cepas de levadura seleccionadas, nos indican que la composición nitrogenada está muy influenciada por la variedad de uva y el tiempo de envejecimiento, mientras que la cepa de levadura con la que se ha realizado la segunda fermentación tiene poca influencia. El hecho de que no se hayan encontrado diferencias importantes en la composición nitrogenada de los vinos espumosos debidas a las cepas de levadura, puede deberse a que se han utilizado tres cepas seleccionadas en un amplio estudio anterior y, por tanto, con características adecuadas para llevar a cabo la segunda fermentación y el envejecimiento de los vinos.

La fracción peptídica de los vinos espumosos de la variedad Malvar es bastante compleja, al igual que la del vino tinto estudiado anteriormente. Los péptidos son glicopéptidos procedentes tanto de las uvas como de las levaduras.

3.3. Bioactividad de los péptidos del vino.

En los últimos años se han dedicado muchos estudios a la búsqueda y caracterización de péptidos bioactivos en diversos alimentos, sin embargo a este tema se le ha dedicado muy poca atención en el caso del vino. Como hemos comentado en la introducción, tan solo existe un trabajo en la literatura (Takayanagi y Yokotsuka, 1999) dirigido a la determinación de actividad antihipertensiva en vinos de distintos orígenes sin haber quedado claro el origen ni las causas de las diferencias de actividad en unos vinos o en otros. También se han descrito péptidos con actividad antioxidante en distintos alimentos, pero no se ha estudiado la presencia de esta actividad biológica en los péptidos del vino. Con el fin de conocer mejor la relación entre los compuestos peptídicos y la bioactividad se ha planteado este estudio. Para ello se han estudiado vinos de mesa comerciales blancos, tintos y espumosos.

3.3.1. Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina en vinos comerciales.

Con el fin de conocer la actividad inhibitoria de la ECA (IECA) de vinos procedentes de distintas regiones vitivinícolas de España y obtenidos con diferentes métodos de elaboración, se han analizado 33 vinos comerciales, 9 de ellos blancos de mesa, 9 tintos y 15 espumosos (apartado 2.1.). Los resultados, valores máximos y mínimos, así como los valores medios de la actividad IECA, expresados como porcentaje se muestran en la figura 3.3-1. En esta figura, también se muestran los resultados obtenidos después de aplicar el test LSD para determinar las diferencias significativas de los valores medios. Los valores resultantes de la actividad IECA de los vinos espumosos fueron, significativamente iguales que los de los vinos blancos, pero diferentes de los vinos tintos, la cual fue significativamente diferente y más alta. El hecho de que los vinos tintos presenten una actividad IECA bastante mayor que la que presentan los vinos blancos, confirma los resultados obtenidos por Takayanagi y Yokotsuka (1999), cuando estudiaron la actividad IECA en dos vinos tintos y cuatro vinos blancos, e indica que puede haber otro grupo de compuestos responsables de dicha actividad, que se encuentren en los vinos tintos en mayor proporción que en los vinos blancos.

Los valores individuales obtenidos para la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina oscilan entre 26,6% y 95,40%, con los valores medios más altos correspondientes a los vinos tintos (83,3% de valor medio) y los más bajos a los vinos blancos de mesa (44,5% de valor medio).

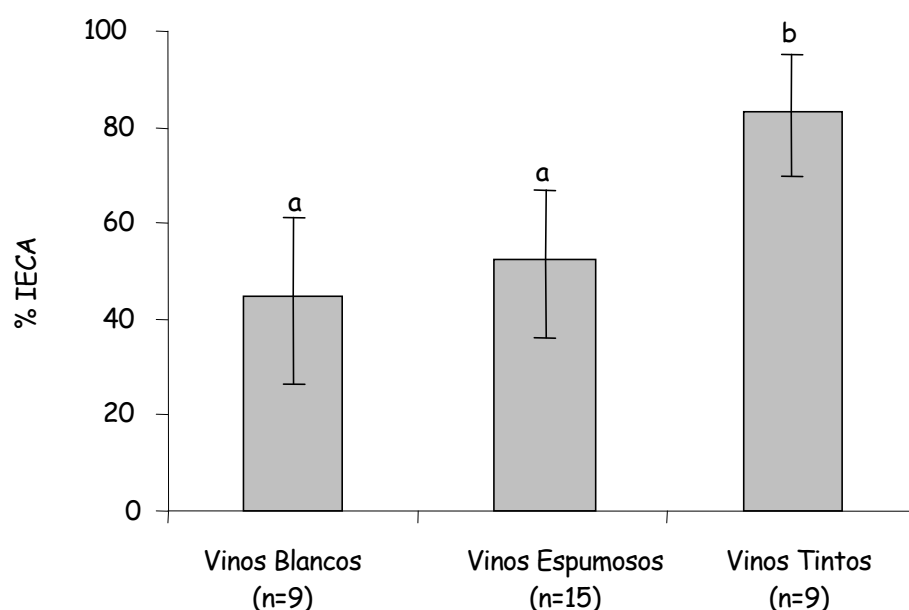


Figura 3.3-1. Valores medios, máximos y mínimos de la actividad IECA de cada uno de los grupos de vinos estudiados. Las letras (a y b) indican el resultado de la aplicación del test LSD, indicando letras diferentes la existencia de diferencias significativas entre los grupos de vinos.

3.3.2. Caracterización de las fracciones con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina en vinos tintos. Influencia de la fermentación maloláctica y del envejecimiento en barrica con lías.

Las muestras de vino tinto estudiadas en este apartado fueron las mismas que se seleccionaron para llevar a cabo el estudio de la fracción peptídica en el apartado 3.1.1.3.

3.3.2.1. Actividad inhibitoria de la ECA de las muestras completas.

Los datos obtenidos de la actividad IECA de estos vinos se muestra en la figura 3.3-2. La actividad IECA en el vino inicial, expresada como porcentaje, es de 88,7, produciéndose un descenso de ésta durante la FML, un poco más pronunciado en el vino que ha realizado la FML en barrica (FML-B) y, a continuación, vuelve a producirse un aumento, siendo algo mayor en el vino D-SL-E12 (94,2) y ligeramente inferior en los otros dos vinos (86,0 en el vino B-L-A_s12 y 80,7 en el vino D-L-A_s12). Estos datos presentan el mismo perfil que los obtenidos para los péptidos

de estos mismos vinos estudiados anteriormente (3.1.1.3.), lo cual puede indicar la relación entre éstos y la actividad IECA.

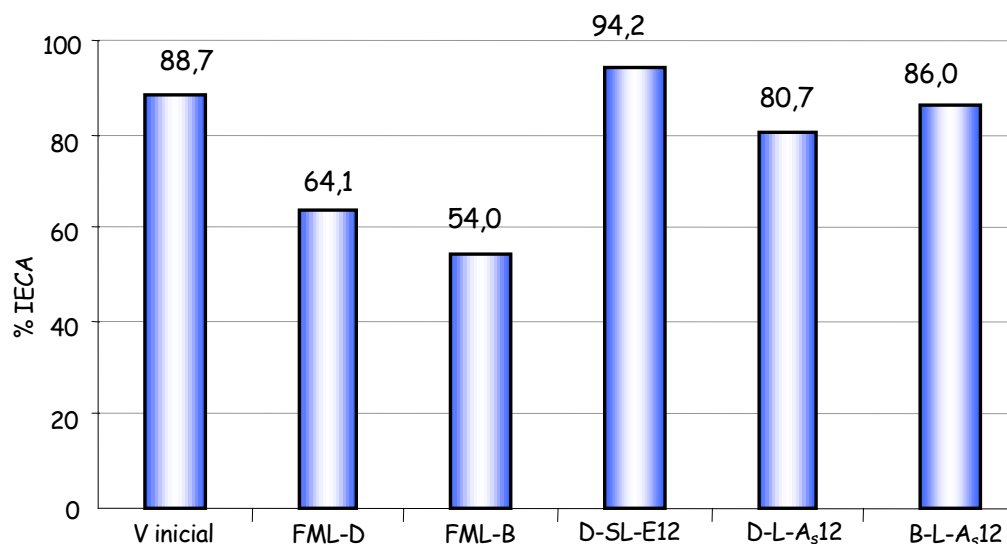


Figura 3.3-2. Actividad IECA (%) de los vinos tintos estudiados.

3.3.2.2. Actividad inhibitoria de la ECA de las fracciones obtenidas por cromatografía de líquidos en una columna abierta de Cosmosil 140 C₁₈-OPN.

Las fracciones que se estudian (F1 y F2), son las mismas que se han estudiado en el apartado 3.1.1.3.a., es decir, el vino inicial, los dos vinos obtenidos después de la fermentación maloláctica (FML-D y FML-B) y los vinos que han sido envejecidos durante 12 meses en barrica, en ausencia de lías (D-SL-E12) o en presencia de lías con agitación semanal (D-L-A₅12 y B-L-A₅12). La concentración de péptidos y la actividad inhibitoria de la ECA de las fracciones estudiadas se muestran en la tabla 3.3-1, junto con la relación entre ambos, y su evolución se puede observar en las figuras 3.3-3, 3.3-4 y 3.3-5, respectivamente.

La concentración de nitrógeno peptídico que se muestra en la tabla 3.3-1 se ha calculado como se describe en el apartado 2.2.5.2. de materiales y métodos. En todos los estudios de bioactividad se ha determinado la concentración de péptidos de esta manera debido a que en el estudio realizado con las fracciones F1 y F2 la cantidad de muestras disponible imposibilitaba la determinación del nitrógeno total, dato necesario para calcular el valor del nitrógeno peptídico como ha sido realizado en los apartados anteriores. En la estimación del nitrógeno peptídico que se realiza en el estudio de la actividad IECA, hay que tener en cuenta que lo que se está cuantificando son los grupos amino primarios en posición α - y los grupos amino primarios en posición ε - de aminoácidos que forman parte de la cadena peptídica. De modo que sería más preciso decir que el valor que se calcula es el nitrógeno amínico primario de los péptidos, pero con el fin de simplificar se ha decidió llamarle nitrógeno peptídico.

Como se puede ver, la concentración de péptidos en la fracción F1 disminuye durante la FML siguiendo la misma evolución que los péptidos de la muestra completa, siendo esta disminución mayor en el vino FML-B. Posteriormente, se produce un aumento de éstos durante el envejecimiento, siendo mayor en el vino D-SL-E12 (figura 3.3-3; tabla 3.3-1).

Tabla 3.3-1. Contenido en péptidos (mg N/L de vino), % actividad IECA y relación entre ambas determinaciones de las fracciones F1 y F2 de las muestras obtenidas de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, de los vinos tintos estudiados.

Muestra	Péptidos	% IECA	IECA / mg nitrógeno peptídico por L de vino
Vinicial F1	15,0	87,7	5,9
FML-D F1	9,3	77,8	8,4
FML-B F1	6,3	80,0	12,6
D-SL-E12 F1	16,1	78,9	4,9
D-L-A _s 12 F1	12,9	94,3	7,3
B-L-A _s 12 F1	12,0	93,8	7,8
Vinicial F2	2,5	68,5	27,2
FML-D F2	2,9	59,0	20,1
FML-B F2	3,1	36,6	11,6
D-SL-E12 F2	1,0	60,8	60,4
D-L-A _s 12 F2	2,0	74,6	36,5
B-L-A _s 12 F2	2,1	78,3	36,7

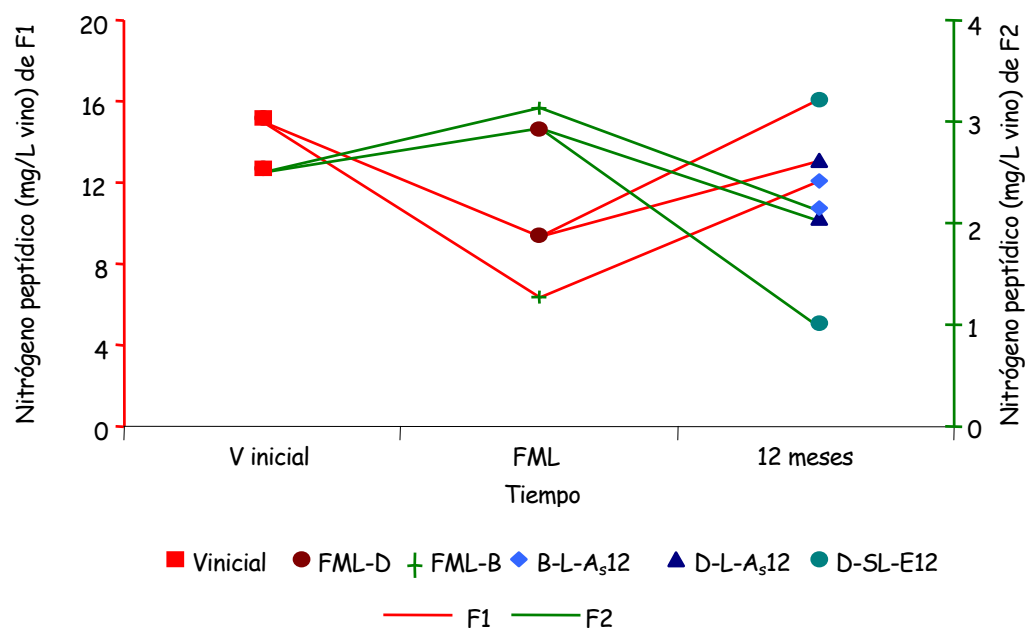


Figura 3.3-3. Cambios en la concentración de péptidos, expresados en nitrógeno peptídico (mg N/L de vino), de las fracciones F1 y F2 aisladas de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, de los vinos tintos estudiados.

Las muestras que presentan una mayor concentración de péptidos en la fracción F2 son aquellas que han sido tomadas tras la FML (vinos FML-D y FML-B), presentando valores, ligeramente, superiores a los del vino inicial (figura 3.3-3). Durante el envejecimiento se produce una disminución de éstos, siendo el contenido en péptidos, mayor en las fracciones de los vinos que han realizado la FML y el envejecimiento con lías (vinos B-L F2 y D-L F2). Por el contrario, la fracción del vino envejecido en ausencia de lías (vino D-SL-E F2) presenta valores en el contenido de péptidos, mucho menores. En todas las muestras, el contenido peptídico es mayor en la fracción 1. En el apartado 3.1.1.3., al estudiar estas mismas fracciones mediante HPLC, se comprobó que el área de los péptidos de la fracción F2 era superior al área de los péptidos de la fracción F1, pareciendo estos dos resultados contradictorios. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la fracción F1 solo se estudia una zona del cromatograma, pudiendo eluir una fracción de péptidos importante antes y después de la zona estudiada.

Los valores de la actividad IECA de las fracciones F1 y F2 disminuyen durante el proceso de fermentación maloláctica y aumentan durante el envejecimiento (figura 3.3-4; tabla 3.3-1).

La comparación de estos resultados de IECA, no puede llevarse a cabo de una manera directa debido a que la cantidad de inhibidor, presente en el medio de reacción, es diferente en cada una de las fracciones. Para poder comparar las actividades IECA de cada una de las fracciones, se relacionó el porcentaje de actividad IECA de cada fracción con la concentración de nitrógeno peptídico (mg de nitrógeno peptídico por litro de vino), procedente de un litro de vino, que hay en cada una de ellas. Al expresar los resultados de la actividad IECA de ambas fracciones de los vinos, con relación al nitrógeno peptídico de las mismas (figura 3.3-5; tabla 3.3-1) podemos observar que la actividad IECA es mucho mayor en la fracción F2 que en la fracción F1 y que los valores mayores se obtienen en los vinos que han envejecido doce meses con las levaduras.

Debido a que la fracción F2 solo contiene péptidos, como hemos visto anteriormente (apartado 3.1.1.3.c.), este resultado pone de manifiesto la importancia de los péptidos en la actividad inhibitoria de la ECA detectada en los vinos.

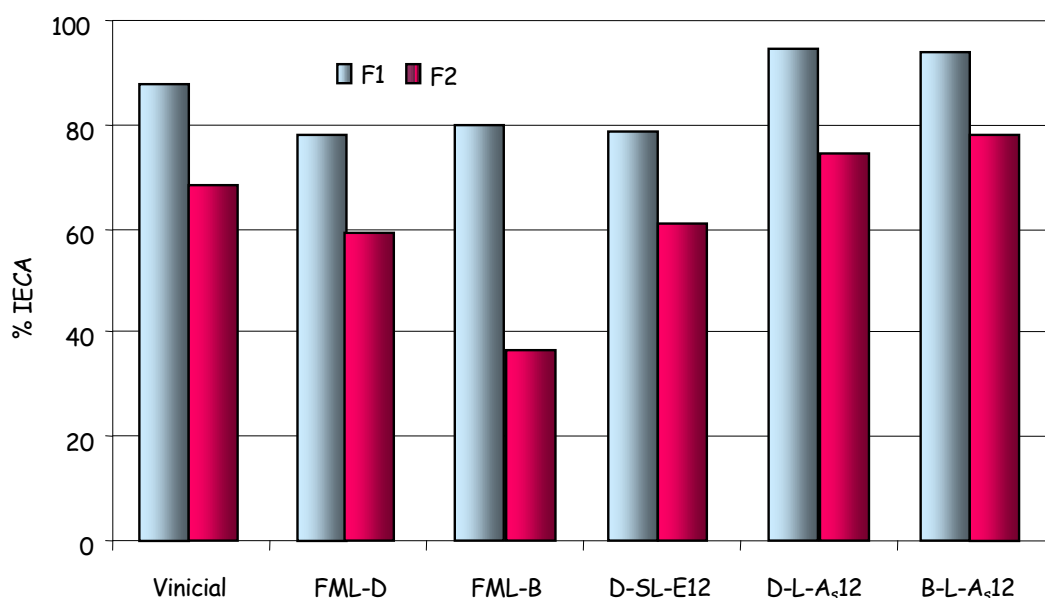


Figura 3.3-4. Actividad IECA (%) de las fracciones F1 y F2 del vino inicial y de los vinos FML-D, FML-B, D-SL-E12, D-L-A₅12 y B-L-A₅12.

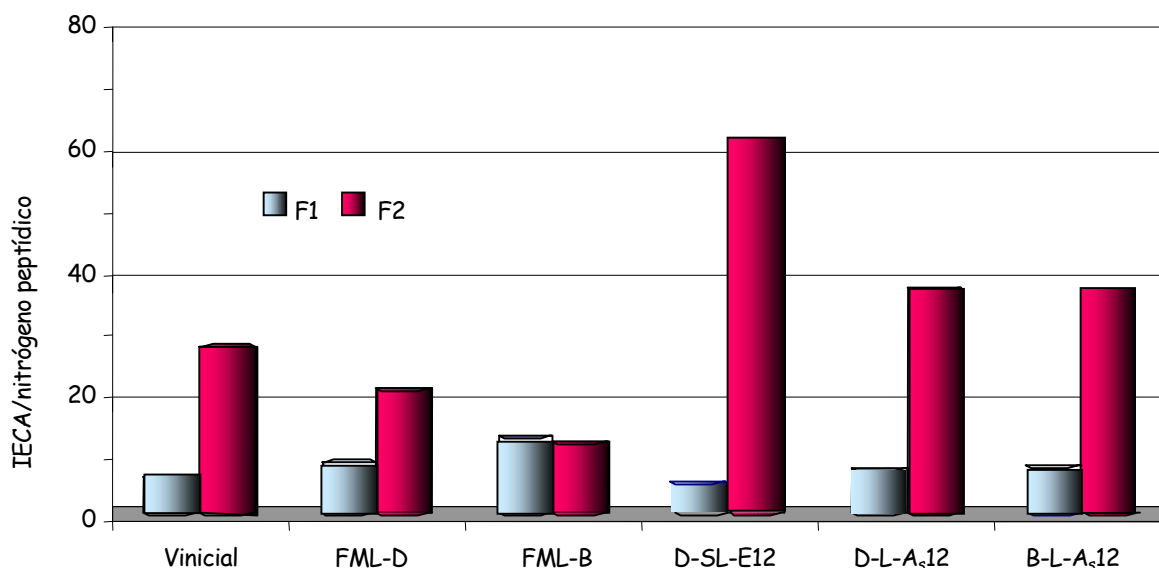


Figura 3.3-5. Relación de la actividad IECA (%) y el contenido en nitrógeno peptídico (mg/L vino) de las fracciones F1 y F2 de las muestras del vino inicial y de los vinos FML-D, FML-B, D-SL-E12, D-L-A₅12 y B-L-A₅12.

3.3.2.3. Fraccionamiento de las fracciones obtenidas del Cosmosil 140 C₁₈-OPN por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa semipreparativa. Estudio de dichas fracciones.

Debido a que las muestras de la fracción 2 presentaron un valor más alto de actividad IECA en función del contenido peptídico y no contenían aminoácidos libres ni fenoles, se realizó el fraccionamiento de una de las muestras (B-L-A₅12 F2) con el fin de realizar el aislamiento de algunos de los péptidos. Para ello se inyectó dicha muestra varias veces en el cromatógrafo semipreparativo, en las condiciones descritas en el apartado 2.3.4.

Se obtuvieron 4 picos mayoritarios cuyos espectros se muestran en la figura 3.3-6. El análisis espectral (tabla 3.3-2), para determinar la posible identidad de los compuestos, se realizó basándonos en los parámetros utilizados por Bartolomé y col. (1997): Máximos de absorción del espectro para las bandas 1, 2 y 3, intervalos de convexidad obtenidos de la 1ª derivada del espectro y máximo de la 2ª derivada. Los intervalos de convexidad se calculan como la diferencia entre las longitudes de onda correspondientes al máximo y mínimo del espectro de la 1ª derivada.

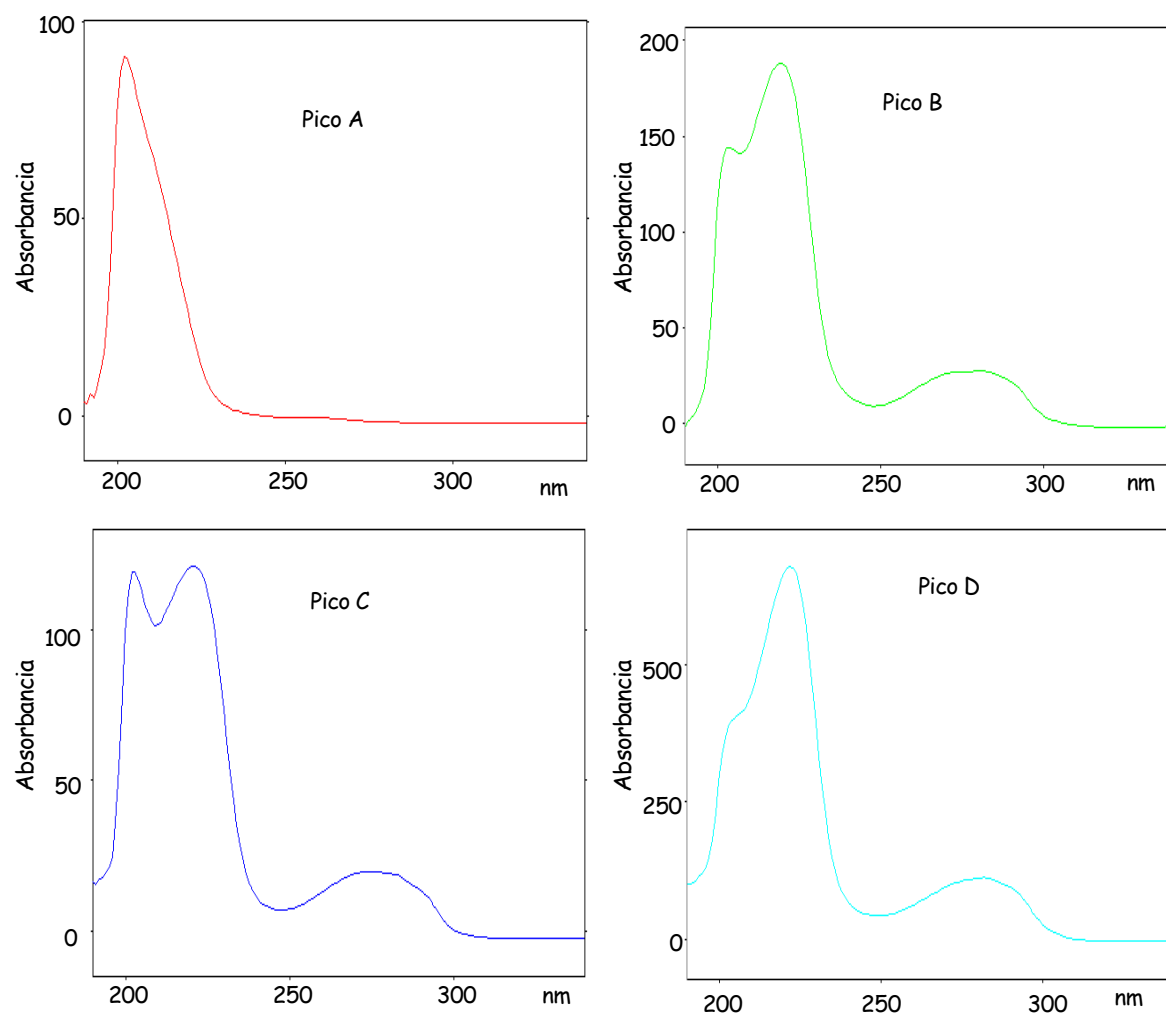


Figura 3.3-6. Espectros de los picos aislados de la fracción F2, mediante cromatografía semipreparativa, del vino a B-L-A_s12.

Tabla 3.3-2. Análisis espectral de los picos aislados de la fracción F2 del vino B-L-A₃12.

	Banda 1		Banda 2		Máximo (2 ^a deriv.)	Banda 3		Compuesto
	máximo	i.c.	máximo	i.c.		máximo	i.c.	
Pico A	202	9	211	7	225	---	---	Péptido con Phe / no aromático
Pico B	203 hombro	8	219	16	232	280	34	Péptido con Trp y/o Trp + Tyr y/o Trp + Phe
Pico C	202	8	220	16	235	275	34	Péptido con Trp y/o Trp + Tyr y/o Trp + Phe
Pico D	203 hombro	7	221	16	234	282	33	Péptido con Trp y/o Trp + Tyr y/o Trp + Phe

Los valores de los máximos y de los intervalos de convexidad de la 1^a derivada (i.c.) están dados en nm.

El pico A es un péptido que contiene como aminoácido aromático a la fenilalanina o no presenta aminoácidos aromáticos en su estructura. Los picos B, C y D se corresponden con péptidos que presentan en su estructura como aminoácido aromático al triptófano, aunque mediante el análisis espectral no es posible saber si está como único aminoácido aromático o, además, presenta conjuntamente Tyr o Phe. Estos aminoácidos aromáticos pueden ser los que potencien la actividad inhibitoria de la ECA de estas fracciones.

Se ha intentado llevar a cabo el análisis de los picos aislados, mediante el empleo de un espectrómetro de masas en tandem. Puesto que no existen bases de datos de proteínas y péptidos presentes en el vino, se creó una propia, con secuencias de péptidos, presentes en vino, descritos, anteriormente, en la bibliografía. Para ello se utilizaron los datos de los péptidos que describieron Takayanagi y Yokotsuka (1999), los descritos por Peng y col. (1997) y por Waters y col. (1998). A pesar de la creación de esta base de datos, no se pudo identificar ninguna estructura peptídica, ya que no coincidían los espectros de masas de las muestras con los espectros teóricos de las secuencias peptídicas de los péptidos de la base de datos creada. Por ello, se decidió secuenciar dichos péptidos mediante degradación de Edman.

Tras los resultados obtenidos mediante el análisis espectral y de la degradación de Edman, se propusieron las siguientes secuencias:

- ♪ WVP (pico A).
- ♪ SFP (pico B).
- ♪ SWF (pico C).
- ♪ SPWR (pico D).

El análisis de los aminoácidos constituyentes de cada pico llevado a cabo después de hidrolizar las muestras, corroboró dichas secuencias. Posteriormente, en un laboratorio externo, se sintetizaron los péptidos anteriormente mencionados y se comprobó que no eluían exactamente al tiempo de retención de los picos aislados del vino. Este resultado era el esperado, pues los péptidos, como se ha indicado anteriormente, son glicopéptidos y, por tanto, presentan una polaridad diferente. Debido a esto, no se calculó el IC₅₀ de dichos péptidos ya que no se hubiera obtenido un resultado real, puesto que la parte glucídica puede modificar de forma considerable las propiedades del péptido (Lattova y col., 2006). Las secuencias peptídicas obtenidas presentan en alguna de las tres últimas posiciones, respecto al C-terminal, aminoácidos aromáticos o a la prolina o algún aminoácido hidrófobo. Estos aminoácidos dan lugar, como se dijo en la introducción, a una mayor actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina de los péptidos, según los datos existentes en la bibliografía.

3.3.3. Caracterización de las fracciones con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina en vinos espumosos. Influencia de la segunda fermentación y del envejecimiento con las levaduras.

En este caso, el estudio se ha llevado a cabo con los mismos vinos de la variedad Malvar estudiados en el apartado 3.2.1.2. Es decir, el vino base (VB) y los vinos espumosos después de la segunda fermentación (FF) y después de nueve y doce meses de envejecimiento (9m y 12m).

3.3.3.1. Actividad inhibitoria de la ECA de las muestras completas.

Los datos obtenidos de la actividad IECA de estos vinos se muestra en la figura 3.3-7. El % de actividad IECA en el vino inicial es de 46,7, produciéndose un aumento hasta los nueve meses de envejecimiento (67,0), disminuyendo, levemente, a los 12 meses (64,1).

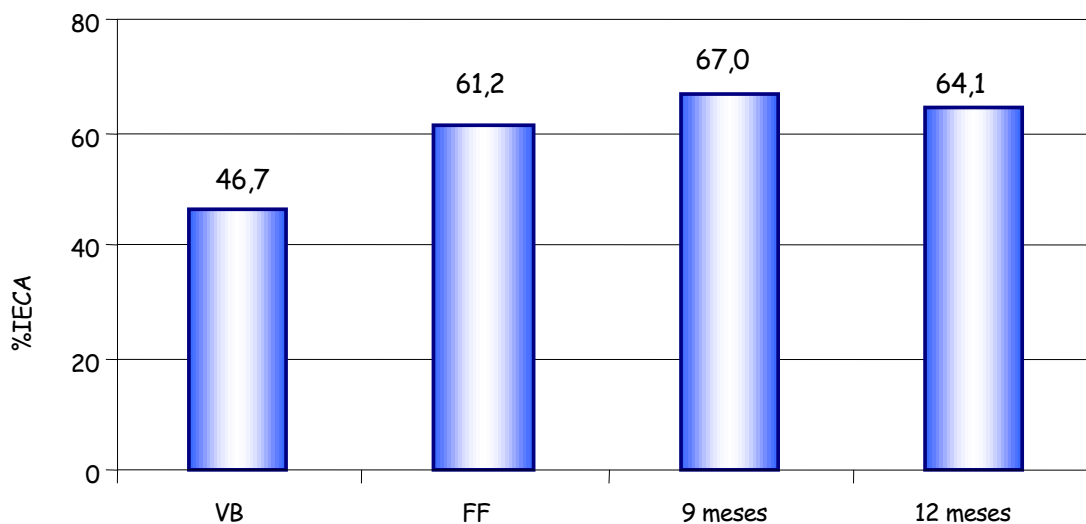


Figura 3.3-7. Actividad IECA (%) del vino base (VB) y de los vinos espumosos FF, 9m y 12m.

3.3.3.2. Actividad inhibitoria de la ECA de las fracciones obtenidas por cromatografía de líquidos en una columna abierta de Cosmosil 140 C₁₈-OPN.

Las fracciones que se estudian (F1 y F2), son las mismas que se han estudiado en el apartado 3.2.1.2.a. Los resultados obtenidos para la concentración de los péptidos de las fracciones estudiadas se muestran en la tabla 3.3-3, junto con el % de actividad inhibitoria de la ECA y la relación entre ambos.

La concentración de péptidos de la fracción F1 (figura 3.3-8) disminuye durante la segunda fermentación (35,9 mg/L para VB y 18,1 mg/L para FF), aumentado durante el envejecimiento hasta alcanzar los valores del vino base (35,1 y 37,8 mg/L para 9m y 12m, respectivamente), de forma análoga a lo que se había observado en el apartado 3.2.1.2.b. La fracción 2 presenta, también en estas muestras, una menor concentración de péptidos que la fracción 1, produciéndose una disminución durante el envejecimiento, hasta los nueve meses (4,0 mg/L), a partir del cual aumenta.

Tabla 3.3-3. Contenido en péptidos (mg N/L de vino), % actividad IECA y relación entre ambas determinaciones de las fracciones F1 y F2 de las muestras, obtenidas de la columna de Cosmosil-140 C₁₈ OPN, del vino base (VB) y de los vinos espumosos FF, 9m y 12m.

Muestra	Péptidos	% IECA	IECA/mg nitrógeno peptídico por L de vino
VB F1	35,9	98,5	2,8
FF F1	18,1	100,0	5,5
9m F1	35,1	99,5	2,8
12m F1	37,8	99,8	2,6
VB F2	6,7	86,0	12,8
FF F2	4,8	83,8	17,6
9m F2	4,0	88,0	22,1
12m F2	5,6	85,2	15,1

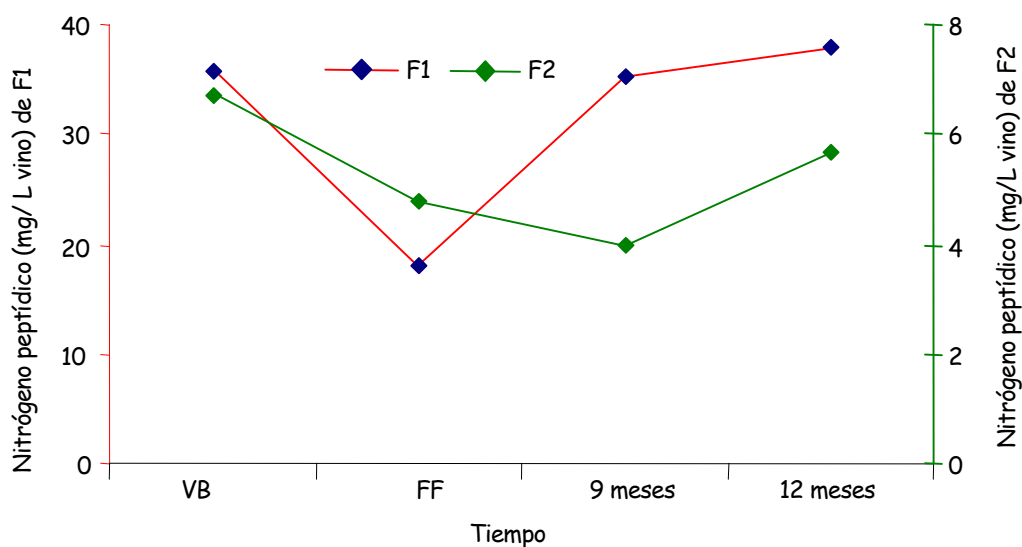


Figura 3.3-8. Cambios en la concentración de péptidos, expresados en nitrógeno peptídico (mg N/L de vino), de las fracciones F1 y F2 del vino base (VB), y de los vinos espumosos FF, 9m y 12m.

En la determinación de la actividad IECA de las muestras de la fracción F1 se han obtenido valores próximos al 100% y mayores que para la fracción F2. Al expresar los valores en relación al nitrógeno peptídico (figura 3.3-9, tabla 3.3-3) los valores de la actividad en función de la concentración peptídica para la fracción F2 son, considerablemente, mayores que los valores obtenidos para la fracción F1. Durante el envejecimiento con las levaduras, hasta los nueve meses, aumenta la relación entre el % de actividad IECA y el contenido en nitrógeno peptídico, de la fracción F2 de las muestras, disminuyendo posteriormente.

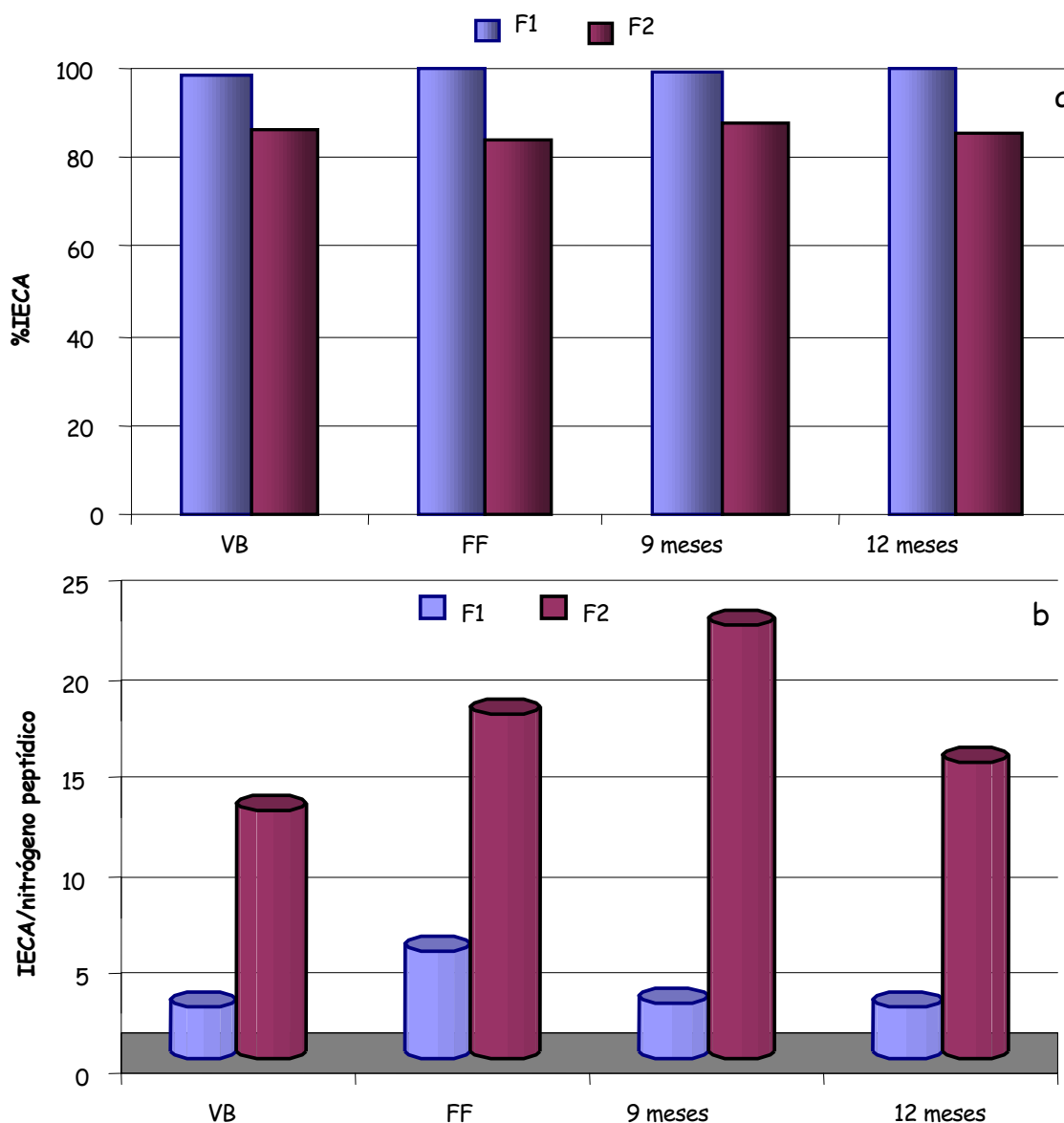


Figura 3.3-9. Actividad IECA (%) (a) y relación de la ésta con el contenido en nitrógeno peptídico (mg/L vino) (b) de las fracciones F1 y F2 del vino base (VB) y de los vinos espumosos FF, 9m y 12m.

Por tanto, el envejecimiento con levaduras produce un aumento de la actividad IECA, pero si los procesos de autólisis siguen evolucionando, los péptidos responsables de dicha actividad pueden hidrolizarse y, por tanto, disminuir la actividad inhibitoria.

3.3.3.3. Fraccionamiento de las fracciones obtenidas del Cosmosil 140 C₁₈-OPN por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa semipreparativa. Estudio de dichas fracciones.

Debido a que, al igual que ocurrió con las muestras del vino tinto, las fracciones F2 presentaron un valor más alto de actividad IECA en función del contenido en nitrógeno peptídico y no contenían aminoácidos libres ni polifenoles, se volvió a fraccionar la muestra 9m F2 para, al menos, aislar y caracterizar algunos de los péptidos que la forman, inyectándose varias veces en el cromatógrafo semipreparativo, en las condiciones descritas en el apartado 2.3.4.

Sólo se obtuvo un pico suficientemente purificado y cuyo espectro se muestra en la figura 3.3-10. Se determinó el contenido en aminoácidos después de la hidrólisis y se realizó el análisis espectral (tabla 3.3-4), basándonos en los parámetros de Bartolomé y col. (1997) como en el apartado 3.3.2.3.

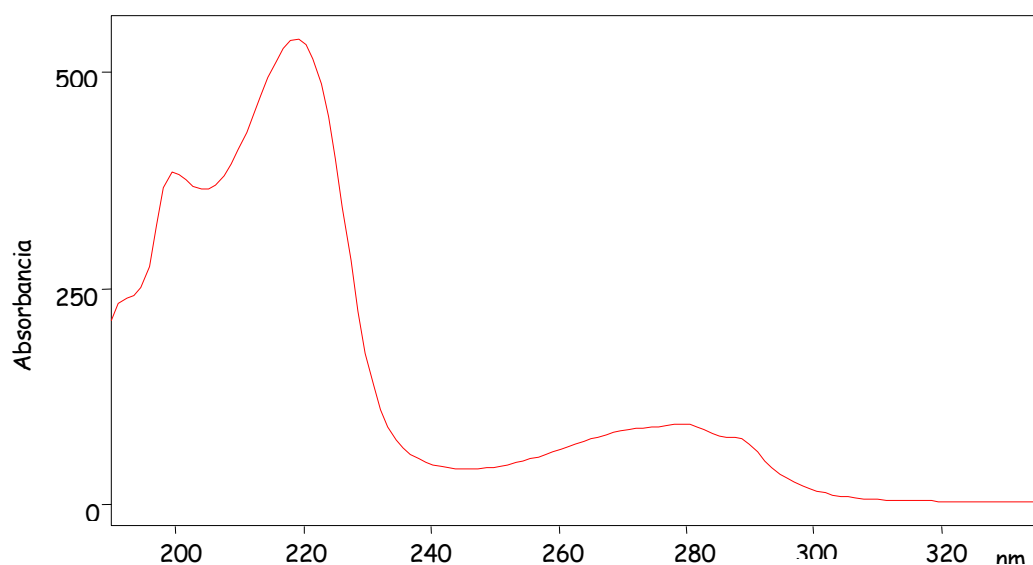


Figura 3.3-10. Espectro del pico aislado de la fracción F2 del vino espumoso envejecido durante 9 meses, mediante cromatografía semipreparativa.

El pico aislado corresponde con un péptido que contiene, en su estructura, como aminoácido aromático al triptófano, aunque mediante el análisis espectral no es posible saber si

está como único aminoácido aromático o, además, presenta conjuntamente Tyr o Phe. Estos aminoácidos aromáticos pueden ser los que potencien la actividad inhibitoria de la ECA de estas fracciones, como se ha comentado anteriormente.

Tabla 3.3-4. Análisis espectral del pico aislado de la fracción F2 del vino espumoso 9m.

	Banda 1		Banda 2		Máximo (2 ^a deriv.)	Banda 3		Compuesto
	máximo	i.c.	máximo	i.c.		máximo	i.c.	
Pico	hombro	5	219	15	230	279	30	Péptido con Trp y/o Trp + Tyr y/o Trp + Phe

Los valores de los máximos y de los intervalos de convexidad de la 1^a derivada (i.c.) están dados en nm.

Se ha intentado llevar a cabo el análisis del pico aislado, mediante el empleo de un espectrómetro de masas en tandem, utilizando el mismo método, empleado en el apartado 3.3.2.3. De nuevo, no se obtuvo ningún resultado satisfactorio. Posteriormente, se secuenció el péptido mediante degradación de Edman. Tras los resultados obtenidos mediante el análisis espectral y de la degradación de Edman, se propuso la secuencia:

♫ **DPPPWG**

para dicho péptido. El análisis de los aminoácidos constituyentes del pico corroboró dicha secuencia.

3.3.4. Bioactividad en un autolisado de levaduras en un medio vínico modelo.

Una vez determinada la actividad IECA en los vinos tintos y en los vinos espumosos, se diseñó este experimento con el objetivo de conocer la posible implicación de los péptidos procedentes de las levaduras en la bioactividad de los péptidos del vino. Para ello se partió de un medio vínico modelo. Las condiciones de las experiencias se indican en el apartado 2.1.4.

3.3.4.1. Evolucion de los compuestos nitrogenados liberados por una cepa de *S. cerevisiae* bajo autolisis acelerada.

En la figura 3.3-11 se muestran los cambios observados en la concentración de los compuestos nitrogenados de alto peso molecular (HMWN) (figura 3.3-11a), del nitrógeno procedente de los aminoácidos libres (figura 3.3-11b) y del nitrógeno peptídico (figura 3.3-11c) durante la autolisis acelerada de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 en el medio vínico modelo. En las primeras horas de autolisis se produce un aumento brusco de los compuestos HMWN, produciéndose una posterior disminución. Un comportamiento similar ha sido descrito en otros trabajos, en los que se utilizan las mismas condiciones experimentales (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000b; Martínez-Rodríguez y col., 2001b). Esta evolución se debe a la liberación y a la posterior degradación de los compuestos HMWN que tienen lugar durante la autolisis de las levaduras. En oposición a esto, la concentración del nitrógeno correspondiente a los péptidos presenta un incremento durante todo el experimento (figura 3.3-11c), lo que demuestra que las proteínas liberadas son hidrolizadas enzimáticamente, en un primer paso, dando lugar a péptidos.

El nitrógeno correspondiente a estos es el mayoritario de la fracción nitrogenada del autolisado. En etapas posteriores de la autolisis, la concentración de aminoácidos también aumenta debido a la actividad enzimática sobre las proteínas y los péptidos presentes en el medio. Estos resultados muestran que los péptidos son los componentes nitrogenados principales involucrados durante el proceso de autolisis, demostrando la importancia de estos compuestos en los vinos envejecidos sobre lías.

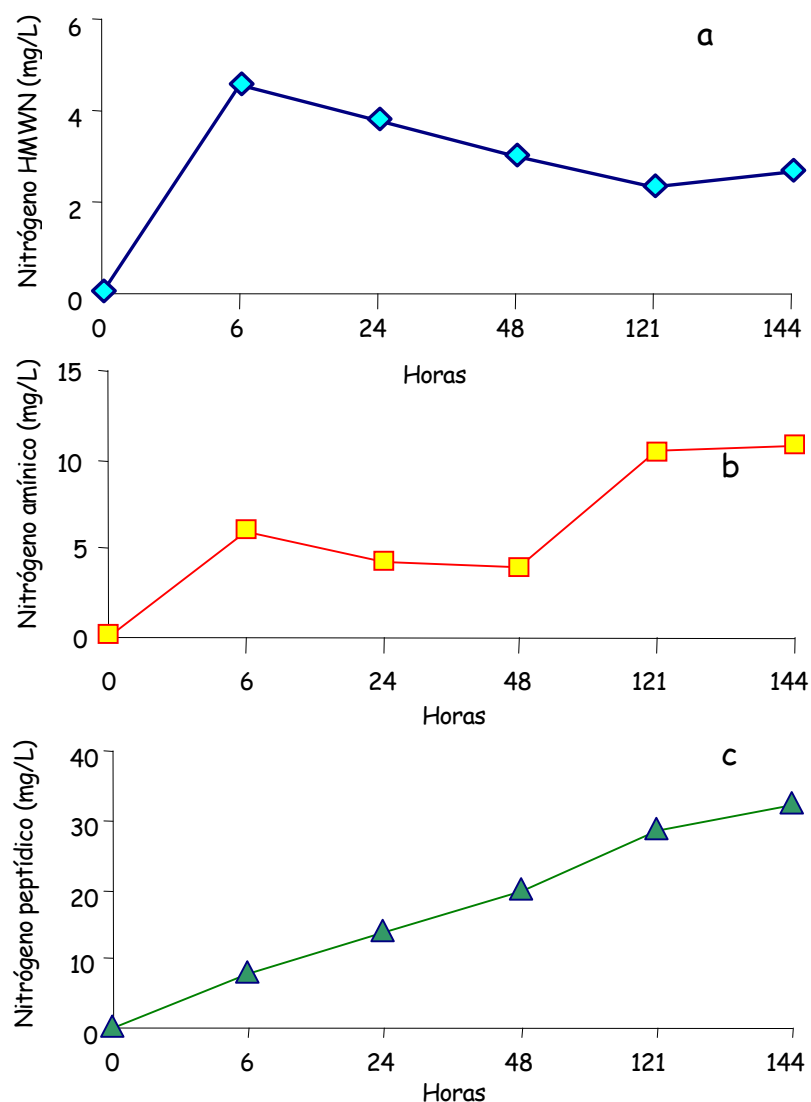


Figura 3.3-11. Cambios en la concentración (mg N/L) de los compuestos (HMWN) (a), del nitrógeno de los aminoácidos libres (b) y del nitrógeno peptídico (c) durante la autólisis acelerada de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 en un vino modelo.

3.3.4.2. Fraccionamiento de los péptidos presentes en el autolisado de levaduras.

Con el propósito de conocer las características de los péptidos presentes en los autolisados de las levaduras, obtenidos a diferentes tiempos, se ha realizado un fraccionamiento de los péptidos, de forma análoga a como se ha realizado, anteriormente, con el vino tinto y el

vino espumoso. En este caso, también se han obtenido dos fracciones. La fracción 1 (F1), contiene los péptidos más polares y los aminoácidos libres, y la fracción 2 (F2), que contiene los péptidos menos polares que los de la F1 y, además, no contiene aminoácidos libres.

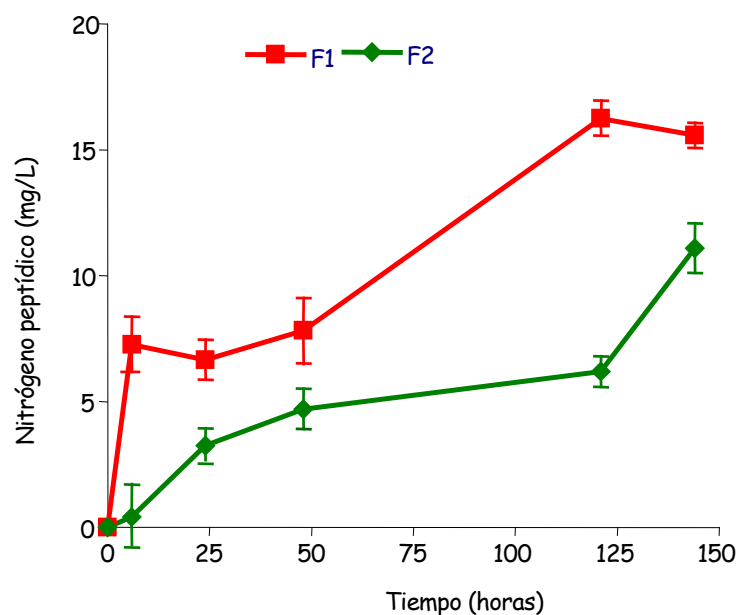


Figura 3.3-12. Cambios en la concentración de péptidos, expresados mg N/L, de las fracciones F1 y F2 aisladas del autolizado.

La figura 3.3-12 muestra la concentración de nitrógeno peptídico, en las dos fracciones estudiadas, en las muestras tomadas durante la autólisis. La fracción 1 contiene una mayor concentración de péptidos y ésta se incrementa a lo largo del tiempo hasta las 121 horas, a partir del cual comienza a disminuir. Este dato concuerda con los obtenidos por Martínez-Rodríguez y Polo (2000b) que comprueban que los péptidos se hidrolizan en péptidos de menor peso molecular y en aminoácidos libres.

La cantidad de péptidos encontrada en la fracción 2 ha sido menor que la de la fracción 1 y se incrementa más débilmente hasta las 121 horas, alcanzando el máximo a las 144 horas, en

donde se produce un brusco incremento. Aunque los péptidos hidrofílicos se han encontrado como la mayor fracción presente en autolisados (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000b), el aumento en la liberación de péptidos hidrofóbicos se produce, sobretudo, en las últimas etapas de la autólisis. A este tiempo, la degradación de la pared celular de las levaduras permite la liberación de muchos polipéptidos y enzimas al medio extracelular (Martínez-Rodríguez y col., 2001b).

3.3.4.3. Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina del autolisado de levaduras.

Los valores del % de actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina obtenidos para los autolisados en los diferentes puntos experimentales se muestran en la figura 3.3-13a. La actividad IECA se incrementa desde el 0% hasta el 65% durante las primeras 121 horas del experimento (tabla 3.3-5). Este comportamiento es similar al observado para la fracción peptídica y sigue el mismo patrón (figura 3.3-11c). Sin embargo, el punto correspondiente a las 144 horas, el porcentaje de actividad IECA disminuye hasta el 60%, aproximadamente. Este resultado evidencia que, a pesar del incremento del contenido en péptidos a lo largo del experimento, no todos ellos contribuyen igual a la actividad IECA. El análisis general de la varianza indica que las diferencias observadas, entre los diferentes porcentaje de la actividad IECA en función del tiempo de envejecimiento son significativas ($p < 0,05$).

Tabla 3.3-5. Concentración, expresada en mg N/L, de los péptidos, % IECA, relación entre ambas determinaciones y actividad antioxidante del autolisado completo, en cada una de las tomas de muestra realizadas.

Horas	Péptidos	% IECA	IECA / mg péptido por L de vino
0	0,0	---	---
6	7,9	13,7	1,7
24	13,8	44,3	3,2
48	19,7	54,7	2,8
121	28,7	64,8	2,3
144	32,4	60,4	1,9

Cuando relacionamos la actividad IECA con la concentración de péptidos presentes en el autolisado (figura 3.3-13b; tabla 3.3-5), cambia la progresión seguida para la IECA. En este caso, el mayor valor se alcanza a las 24 horas, siguiendo un descenso continuo hasta las 144 horas. Esto puede indicar que, aunque se estén liberando péptidos a lo largo del proceso, no todos los péptidos contribuyen a la actividad IECA de la misma manera, es decir, la contribución de cada péptido sobre la actividad IECA puede ser diferente, como se ha comentado anteriormente.

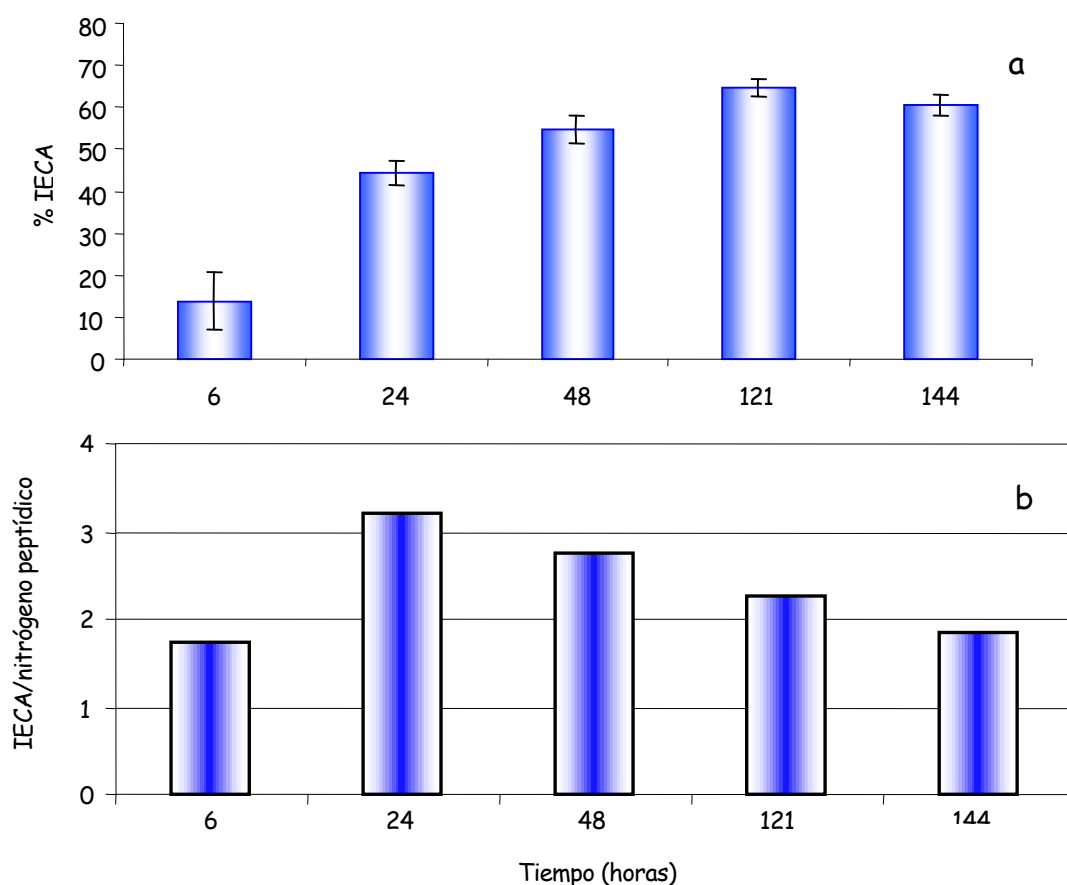


Figura 3.3-13. % Actividad IECA (a) y relación de ésta con la concentración de nitrógeno peptídico (b) del autolisado completo, correspondiente a diferentes puntos experimentales.

Cada una de las fracciones (F1 y F2) obtenidas de los autolisados fueron sometidas al análisis para determinar la implicación de cada una de ellas sobre la actividad IECA. Los resultados obtenidos en este estudio, así como su relación con el contenido peptídico de cada una de ellas, se muestran en la figura 3.3-14a-b y sus valores se pueden ver en la tabla 3.3-6.

Tabla 3.3-6. Concentración, expresada en mg N/L, de los péptidos, % IECA, relación entre ambas determinaciones y actividad antioxidante de las dos fracciones (F1 y F2) obtenidas del autolisado, en cada una de las tomas de muestra realizadas.

Horas	Péptidos	% IECA	IECA / mg péptido por L de vino
Autolisado F1			
0	0,0	---	---
6	7,3	5,8	0,8
24	6,7	15,6	2,3
48	7,8	19,7	2,5
121	16,3	20,6	1,3
144	15,6	24,7	1,6
Autolisado F2			
0	0,0	---	---
6	0,4	0,01	0,0
24	3,2	10,5	3,3
48	4,7	29,6	6,3
121	6,2	48,4	7,8
144	11,1	38,3	3,4

Como puede verse se vuelve a corroborar que la fracción 2 es la responsable principal de la actividad IECA observada, a pesar de la menor concentración de péptidos (figura 3.3-14a). El % de actividad IECA de la fracción 1 no presenta diferencias significativas ($p>0,05$) en ninguno de los autolisados. Sin embargo, desde las 24 horas de autólisis, el % de actividad IECA de la fracción 2 aumenta significativamente ($p<0,05$) hasta alcanzar un valor máximo, aproximadamente, del 48% a las 121 horas (figura 3.3-14a; tabla 3.3-6). Los cambios observados en el % de actividad IECA de la fracción 2 son similares a los resultados obtenidos en el análisis de la actividad IECA del autolisado total. En este caso, la actividad IECA disminuye después de 144 horas de autólisis, aunque la fracción 2 incrementa la concentración de péptidos en ese tiempo. Estos resultados muestran que algunas modificaciones podrían estar sucediendo en la

fracción 2 dando como resultado una reducción en la actividad IECA. Los valores de la relación entre el % de actividad IECA y la concentración de péptidos (figura 3.3-14b), presenta valores mayores para la fracción F2, a pesar de que la concentración de péptidos es menor. Esto significa que no solo se liberan péptidos de diferente tamaño e hidrofobicidad al medio por acción de las proteasas intracelulares, sino que, simultáneamente ocurre una liberación de proteasas al medio que da lugar a la hidrólisis de los péptidos, dando lugar a péptidos nuevos y modificándose sus propiedades (Moreno-Arribas y col., 1998b).

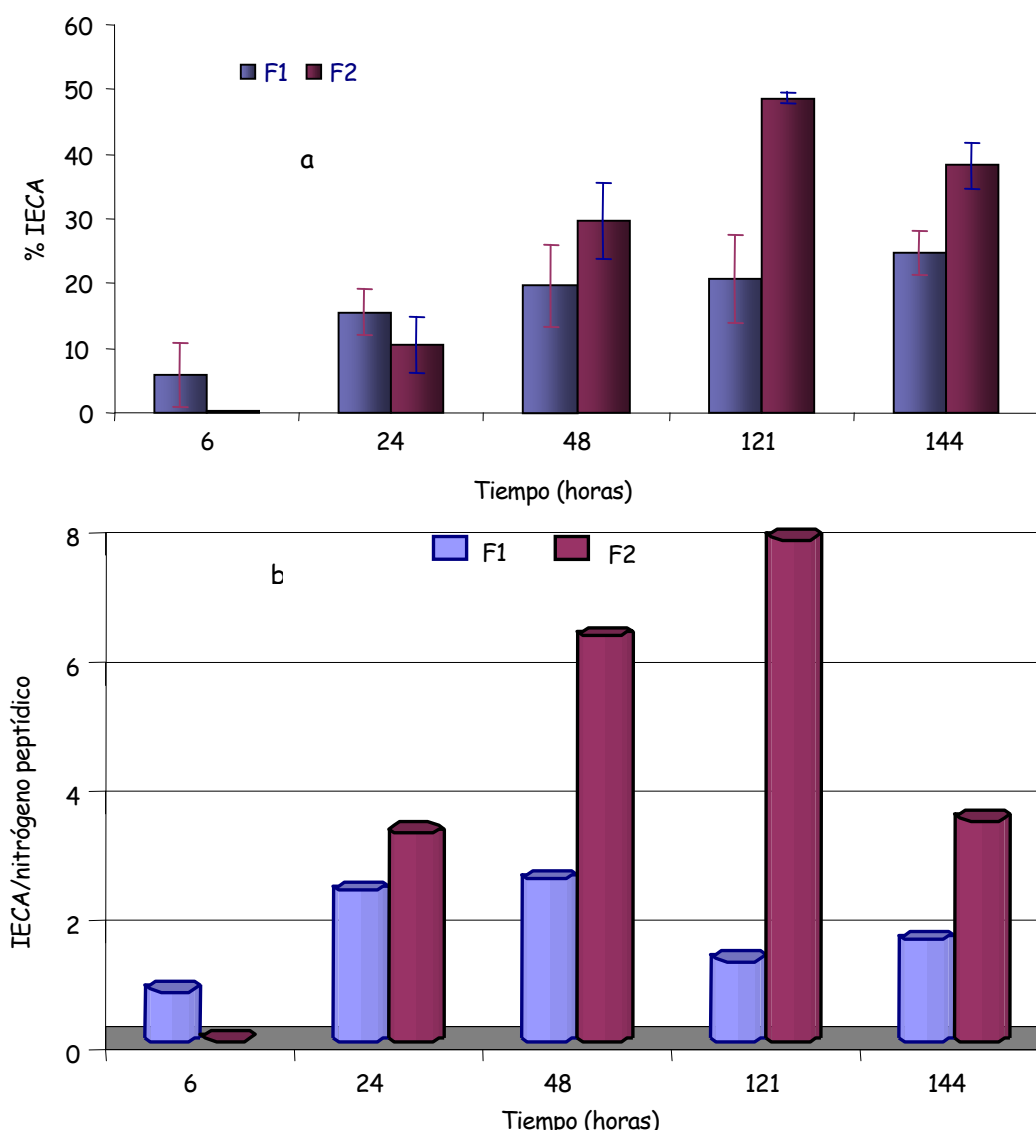


Figura 3.3-14. Actividad IECA (a) y relación de ésta con la concentración de nitrógeno peptídico (b) de cada una de las fracciones (F1 y F2) aisladas del autolizado, correspondiente a diferentes puntos experimentales.

3.3.4.4. Actividad antioxidante del autolisado de levaduras

Algunos péptidos derivados de la fermentación de alimentos y que presentan actividad IECA, pueden ser multifuncionales, mostrando, a su vez, actividad antioxidante (Hernández-Ledesma y col., 2005; Dávalos y col., 2004). Algunos autores han estudiado la actividad antioxidante de extractos de levadura y de levaduras hidrolizadas (Lee y col., 2006; Moskovitz y col., 1997), demostrando la potencial contribución de las levaduras a la actividad antioxidante del vino. Esto último es, especialmente, interesante para vinos cuyo proceso de elaboración incluye un periodo de envejecimiento sobre lías.

La figura 3.3-15a muestra los resultados obtenidos en el estudio de la actividad antioxidante de los autolisados por medio del ensayo ORAC. La actividad antioxidante ha tenido un incremento significativo ($p < 0,05$) durante las primeras 24 horas de autólisis, produciéndose una disminución, posteriormente, hasta alcanzar a las 144 horas valores similares a los de las 6 horas (tabla 3.3-7). La disminución más importante tiene lugar a las 144 horas, coincidiendo con los resultados obtenidos en el estudio de la actividad IECA. Aunque los péptidos son los principales componentes del autolisado, algunos aminoácidos libres podrían estar presentes, participando en la actividad antioxidante por reacción con los radicales peróxido (Meucci y Mele, 1997; Park y col., 2005). Debido a esto, la fracción de péptidos debe ser aislada para conocer su implicación real en las propiedades antioxidantes de los autolisados.

Tabla 3.3-7. Concentración de los péptidos (mg N/L vino) y de la actividad antioxidante del autolisado completo y de las dos fracciones (F1 y F2) obtenidas del mismo, en cada una de las tomas de muestra realizadas.

Horas	Péptidos	ORAC-FL ($\mu\text{mol trolox/mg N péptidos + aminoácidos libres}$)
Autolisado completo		
0	0,0	---
6	7,9	17,6
24	13,8	27,1
48	19,7	23,6
121	28,7	24,1
144	32,4	18,5
Autolisado F1		
0	0,0	---
6	7,3	9,4
24	6,7	12,5
48	7,8	11,2
121	16,3	10,2
144	15,6	9,1
Autolisado F2		
0	0,0	---
6	0,4	5,5*
24	3,2	12,2*
48	4,7	25,3*
121	6,2	45,6*
144	11,1	19,5*

*Valores correspondientes sólo a nitrógeno peptídico

La figura 3.3-15b muestra la actividad obtenida por medio del ensayo ORAC para las dos fracciones (F1 y F2). La actividad antioxidante sigue los mismos patrones que la actividad IECA, incrementándose hasta las 121 horas, disminuyendo, posteriormente, a las 144 horas para la fracción 2. Al igual que la actividad IECA, la fracción 2 es la principal responsable de este resultado, alcanzando a las 121 horas más del 75% de la actividad antioxidante total (tabla 3.3-7). Así, es posible que los péptidos hidrofóbicos, también implicados en la actividad IECA, puedan ser los principales responsables de la actividad antioxidante. Este resultado sugiere que la liberación de los péptidos de las levaduras durante la autólisis en condiciones vínicas puede dar lugar a actividad multifuncional.

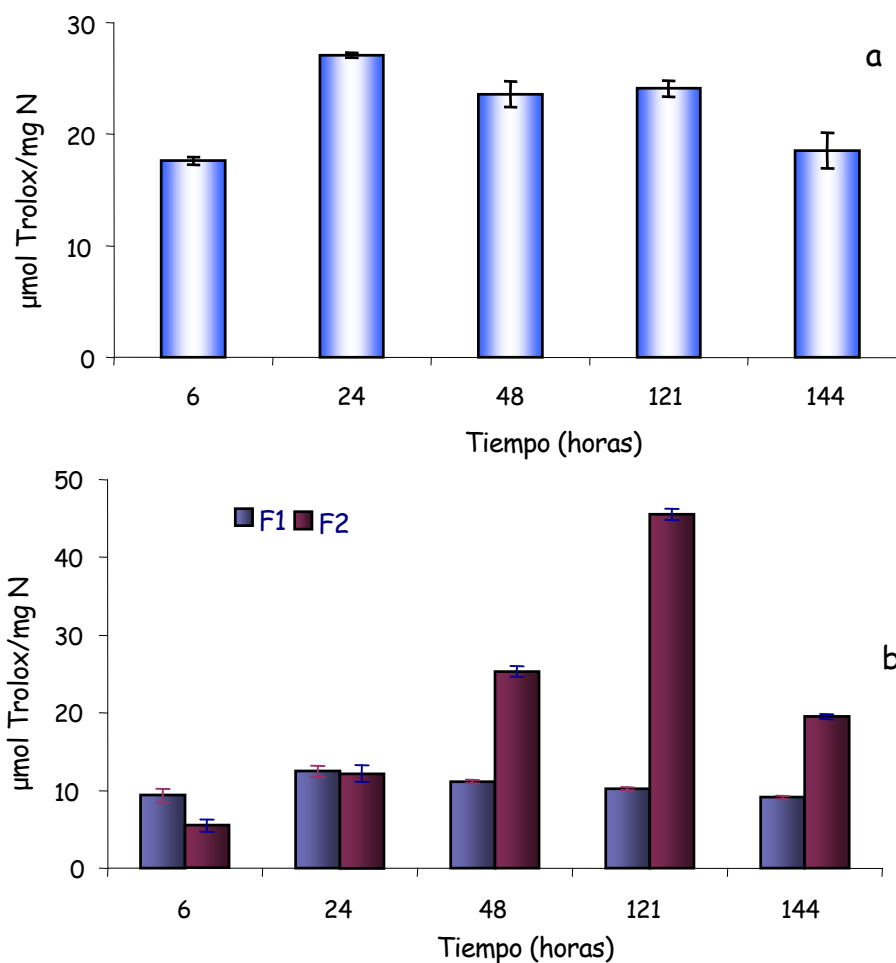


Figura 3.3-15. Actividad antioxidante correspondiente al nitrógeno de péptidos más aminoácidos libres del autolisado completo (a) y de las fracciones F1 y F2 aisladas del autolisado (b). F1 contiene péptidos más aminoácidos libres y F2 solo contiene péptidos.

Son necesarios más estudios para identificar los péptidos responsables de estas actividades y cuantificar su contribución a la respuesta observada. Estos resultados podrían ser, particularmente, interesantes para la elaboración de algunos vinos especiales, envejecidos sobre lías, tales como los vinos espumosos elaborados por el método tradicional y algunos vinos blancos y tintos, los cuales podrían ser enriquecidos para aumentar sus propiedades bioactivas derivadas de los procesos de envejecimiento sobre lías.

3.3.5. Resumen de los principales resultados obtenidos del estudio de la bioactividad de los péptidos del vino.

En el estudio de la actividad inhibidora de angiotensina de 33 vinos comerciales blancos de mesa, espumosos y tintos, hemos comprobado que los que tienen una mayor actividad IECA son los vinos tintos y los que menos los blancos de mesa.

En el estudio de los cambios de la actividad IECA de un vino tinto durante la fermentación maloláctica y el envejecimiento en barrica, con y sin lías, hemos comprobado que la actividad IECA disminuye durante la fermentación maloláctica y aumenta durante el envejecimiento. Las dos fracciones de péptidos estudiadas, fracción más polar y menos polar, tienen actividad IECA, siendo esta mayor en la fracción que contiene los péptidos menos polares.

Se ha propuesto la identidad de cuatro péptidos con actividad IECA: WVP, SFP, SWF y SPWR. Probablemente estos péptidos son glicopéptidos.

En el estudio de la actividad IECA de los vinos espumosos se ha comprobado que aumenta durante la segunda fermentación y durante los primeros nueve meses de envejecimiento y disminuye posteriormente. También en estos vinos la fracción que contiene los péptidos menos polares es la que presenta mayor actividad.

Se ha propuesto la identidad de un péptido con actividad IECA: DPPPWG, que, probablemente, como en el caso del vino tinto, es un glicopéptido.

Durante la autólisis de las levaduras en un medio vínico, se ha comprobado que se liberan compuestos con actividad IECA. La actividad IECA global aumenta en el tiempo, pero disminuye cuando se relaciona con el nitrógeno peptídico. De nuevo, la fracción más activa es la fracción que contiene los péptidos menos polares. En estos autolisados se ha encontrado, además, actividad antioxidante, mayor en la fracción de los péptidos menos polares y aumenta de forma importante durante el envejecimiento.

3.4. Desarrollo de un método de cromatografía de líquidos de alta temperatura para el estudio on-line de compuestos bioactivos.

Debido a las conocidas ventajas de la HTLC para el estudio on-line de actividades enzimáticas, como quedó recogido en la introducción (apartado 1.5.), diseñamos un método de HTLC que permitió realizar la determinación de diversas actividades enzimáticas on-line. En primer lugar ha sido necesario optimizar las variables asociadas a la cromatografía de líquidos de alta temperatura para, posteriormente, abordar la optimización de las variables que afectan a las reacciones enzimáticas objeto de estudio.

3.4.1. Optimización del método de separación mediante HTLC.

Se ha realizado la optimización de la separación de muestras complejas mediante cromatografía líquida a alta temperatura (HTLC). Para ello se han tenido en cuenta diferentes variables como la composición de la fase móvil, la estabilidad del relleno de la columna, la temperatura de la columna y el flujo de la fase móvil.

3.4.1.1. Composición de la fase móvil.

Con el fin de poder acoplar el sistema de HTLC a un detector ESI-MS, es imprescindible utilizar en la fase móvil tampones de sales volátiles, como el formiato amónico (sal muy utilizada en la bibliografía en acoplamientos de HPLC y ESI-MS). Sin embargo, debido a la descomposición de esta sal, lo cual provoca fluctuaciones en la señal y afecta a los tiempos de retención de los analitos, la HTLC ha sido realizada con ácido acético como fase móvil, obteniéndose separaciones comparables.

En los sistemas de HTLC, la fase móvil se precalienta antes de entrar en la columna, como ha sido comentado en apartados anteriores, debido a que se ha comprobado que la temperatura de entrada del eluyente en la columna influye de manera significativa en la eficacia de la misma. El precalentamiento de la fase móvil es necesario para evitar gradientes de temperatura en el interior de la columna, lo cual podría dar lugar a un ensanchamiento adicional en los picos del cromatograma (figura 1.5-4) (Yan y col., 2000; Djordjevic y col., 1999; Thompson y col., 2001; Wolcott y col., 2000). Un problema que se presenta con este precalentamiento de la fase móvil es, por un lado, las fluctuaciones que se producen en la señal cromatográfica, debido a que la fase móvil que sale de la columna a alta temperatura no permanece en su totalidad en

estado líquido (el disolvente permanece en estado líquido por disminución de la presión, debido tanto a la disminución de la viscosidad como de la tensión superficial de la fase móvil), y por otro lado, si queremos llevar a cabo un ensayo bioquímico en línea postcolumna, las altas temperaturas del eluido que, al mezclarse con la enzima, puede destruir a ésta. Para evitar esto, se hace necesario el enfriamiento de la fase móvil a la salida de la columna, lo cual se ha realizado utilizando un baño de agua termostatzado a 25 °C, en el que se sumergen los capilares procedentes de la columna por los que circula el eluyente antes de llegar al detector. Los resultados obtenidos muestran que este sistema de refrigeración es adecuado.

Se ha evaluado la idoneidad de la fase móvil antes del acoplamiento en línea del sistema de flujo continuo al detector de masas, inyectando una mezcla de benzoato de metilo, de etilo y de propilo (50 µM de cada uno de ellos). Se ha utilizado una columna DiamondBond C₁₈ (100 mm de longitud x 4,6 mm diámetro interno, 3 µm, 300 Å), un detector de ultravioleta (230 nm) y un flujo de 1 mL/min (figura 2.8-1). La experiencia, realizada a 160 °C, ha dado lugar a que la mezcla de benzoatos se resuelva en picos con un factor de asimetría menor de 1,5. La repetibilidad de la separación se ha llevado a cabo inyectando 20 veces la mezcla. Los resultados, con desviaciones standards (SD) del 0,1% con relación a los tiempos de retención, del 4,5% respecto a las áreas de los picos y del 4,6% para la altura de pico, se pueden considerar adecuados.

3.4.1.2. Estabilidad térmica del relleno de la columna.

El empleo de rellenos cromatográficos de materiales estables térmicamente (polímeros, zirconio o carbono gráfico), los cuales no se solubilizan cuando se utilizan altas temperaturas, ni pierden poder de resolución, permite el uso de temperaturas superiores a 200 °C (Claessens y van Straten, 2004; He y Yang, 2003).

La primera columna utilizada en los experimentos ha sido una columna comercial DiamondBond®-C₁₈. Las partículas de DiamondBond son de carbono recubiertas de zirconio, estable en todos los niveles de pH. Tiene una selectividad intermedia entre las columnas de octadecilsilice (ODS) y las de los soportes de carbono no enlazados que son usados en fase inversa. Los ligandos C₁₈ se enlazan a la superficie con enlaces carbono-carbono muy estables, por lo que las columnas, en teoría, resisten condiciones químicas extremas de fase móvil y de temperatura. Sin embargo, después de varios análisis, se ha comprobado que se producen pérdidas del material de relleno al someterlas a altas temperaturas (superiores a 160 °C),

fenómeno que ha sido descrito en la bibliografía, dándose, en algunos casos, degradación en columnas fabricadas especialmente para altas temperaturas (Marín y col., 2004).

Debido a los resultados obtenidos con la columna comercial, se han fabricado en el laboratorio una serie de columnas con los siguientes rellenos: Zirchrom®-PBD-RP, Pathfinder AP y PRP-1 C₁₈. Los dos primeros rellenos, después de varios análisis, también han producido pérdidas de material de empaquetamiento cuando se han sometido a altas temperaturas (superiores a 160 °C). La columna Pathfinder AP mostró, en un primer momento, una buena eficacia, pero ésta disminuyó rápidamente debido a la pérdida de material de empaquetamiento.

En la figura 3.4-1 se muestran los cromatogramas obtenidos, en dos separaciones diferentes, de una mezcla de cuatro flavonoides utilizando la columna Pathfinder AP. Las condiciones de análisis en ambos casos (figuras 1a-b) se mantuvieron constantes, y entre ambas inyecciones, que dan lugar a los cromatogramas mostrados en la figura 3.4-1, la columna se ha sometido a una temperatura de 180 °C durante 30 minutos. Como se puede observar la eficacia de la columna disminuye rápidamente, produciéndose un aumento en los tiempos de retención, ensanchamiento de los picos y pérdida de resolución. Para intentar resolver este problema, se ha cambiado ligeramente el procedimiento de empaquetado, utilizando metanol como disolvente en lugar de acetona, se han utilizado fritados en la columna de tamaño de poro más pequeño (de 2 µm a 0,5 µm) y, en este caso, se ha disminuido la temperatura de análisis (inferior a 160 °C). Sin embargo, los problemas aún persistieron. A la vista de los resultados, se ha decidido utilizar otro material de empaquetamiento, utilizándose el relleno PRP-1 C₁₈, el cual ha presentado una buena eficacia y estabilidad para altas temperaturas.

Para todas las muestras analizadas con esta última columna, no se ha detectado ningún desdoblamiento de picos, ni disminución del área, ni excesivos aumentos en la anchura de los picos y el espectro de masas de los inhibidores no muestra indicación alguna de descomposición térmica. En ocasiones, las altas temperaturas aplicadas pueden empeorar las separaciones cuando las muestras son termolábiles o cuando dan lugar a reacciones en el interior de la columna (Thompson y Carr, 2002).

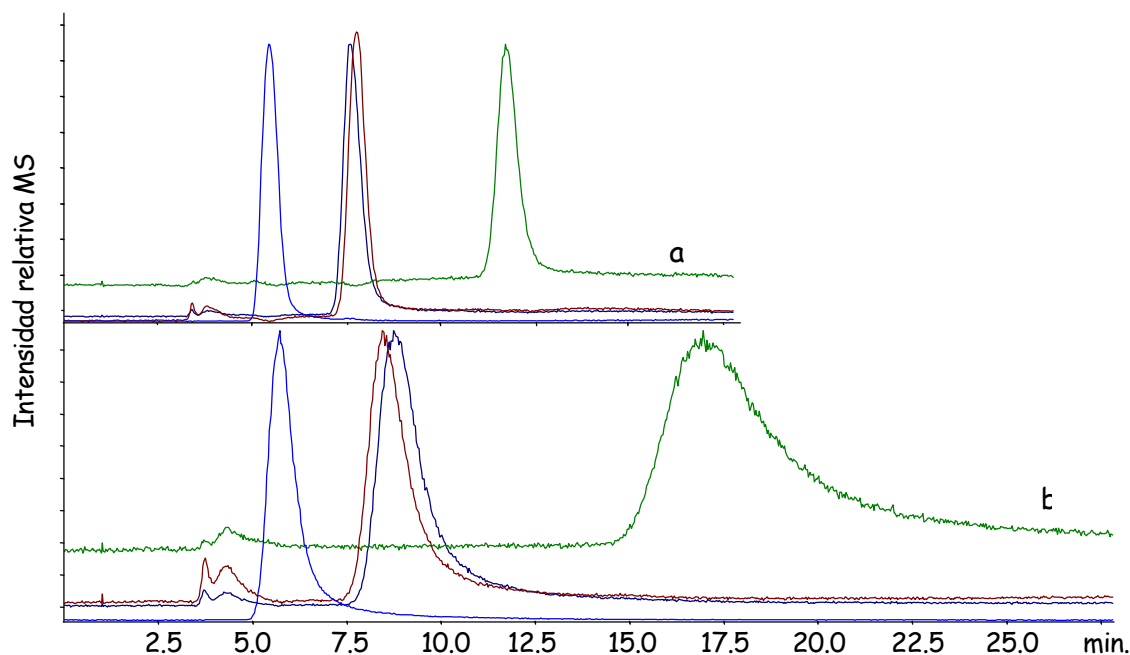


Figura 3.4-1. Pérdida de la eficacia de una columna Pathfinder; cromatogramas de cuatro flavonoides antes (a) y después (b) de someterla a 180 °C durante 30 min.

3.4.1.3. Temperatura de la columna.

3.4.1.3.a. Influencia de la temperatura sobre la retención cromatográfica.

Para conocer como influye la temperatura sobre la separación cromatográfica se ha llevado a cabo la separación de los tres ésteres utilizados en el apartado 3.4.1.1. (benzoato de metilo, de etilo y de propilo), utilizando diferentes temperaturas desde 80 hasta 160 °C y un flujo constante. La columna utilizada en este estudio fue la DiamondBond C₁₈. Como puede observarse en la figura 3.4-2, el incremento de temperatura aumenta la eficacia de la columna y produce una disminución en los tiempos de retención, llegando a ser dicha disminución superior al 84%.

3.4.1.3.b. Influencia de la temperatura sobre la concentración de disolvente orgánico.

En un estudio realizado por de Boer y col. (2004), sobre la separación de inhibidores de la catepsina B mediante un ensayo bioquímico de flujo continuo utilizando RPLC, se aplican

gradientes que presentan valores superiores al 95% de metanol en la fase móvil. Sin embargo, valores superiores al 30% de metanol en ésta dan lugar a la reducción de la actividad enzimática en un 50%. Por tanto, la disminución en la cantidad de disolvente orgánico en la fase móvil sin disminuir la resolución, ni la eficacia de la separación, puede dar lugar a una mejora del acoplamiento de la LC con el ensayo bioquímico.

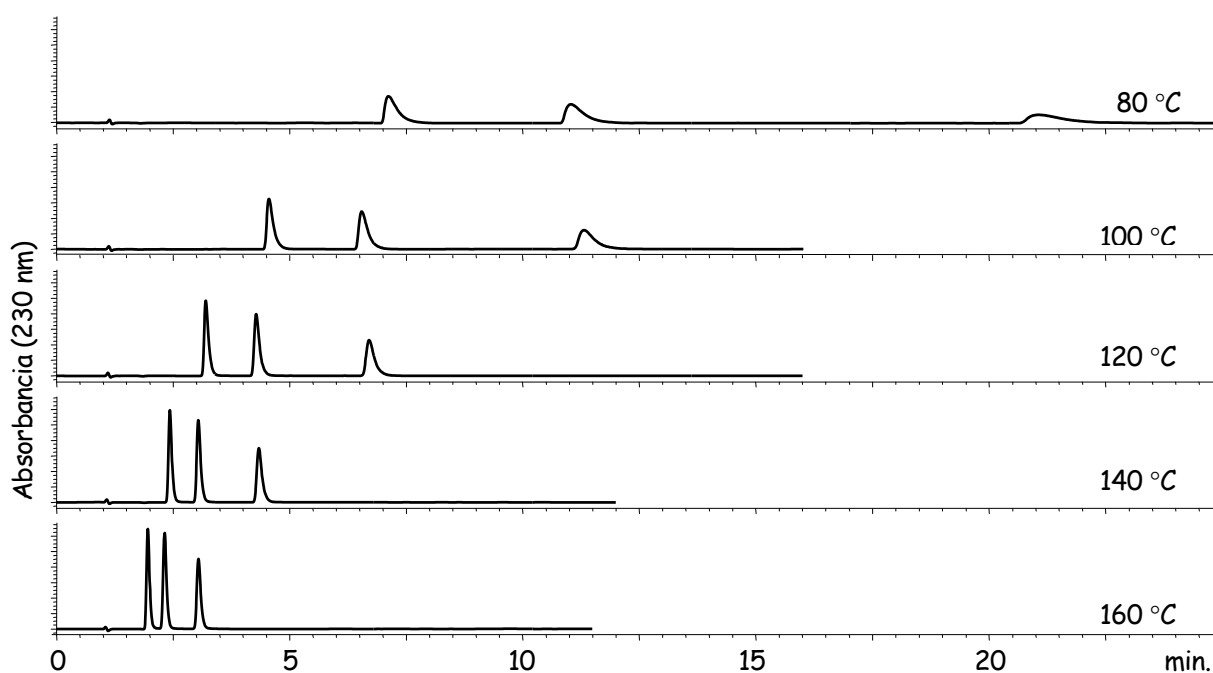


Figura 3.4-2. Influencia de la temperatura en la repetición cromatográfica. Flujo 1 mL/min.

Por esto, es necesario evaluar el efecto de la disminución de disolvente orgánico en la fase móvil en HTLC. Para ello, se ha llevado a cabo la separación de la mezcla de los tres benzoatos (metilo, etilo y propilo, 50 μ M en cada uno de ellos) (figura 3.4-3), en una columna DiamondBond[®]-C₁₈. Se han utilizado condiciones combinadas de concentración de metanol y de temperatura (40% de metanol, 140 °C y 85% metanol, 40 °C). Los resultados que se obtienen muestran que se produce una pequeña disminución en los tiempos de retención cuando se utiliza el 40% de metanol a 140 °C respecto a cuando se utiliza 85% de metanol a 40 °C, observándose,

también, una mejor resolución y eficacia. Esto indica que se puede reducir de forma considerable la cantidad de disolvente orgánico si se utilizan altas temperaturas en la separación.

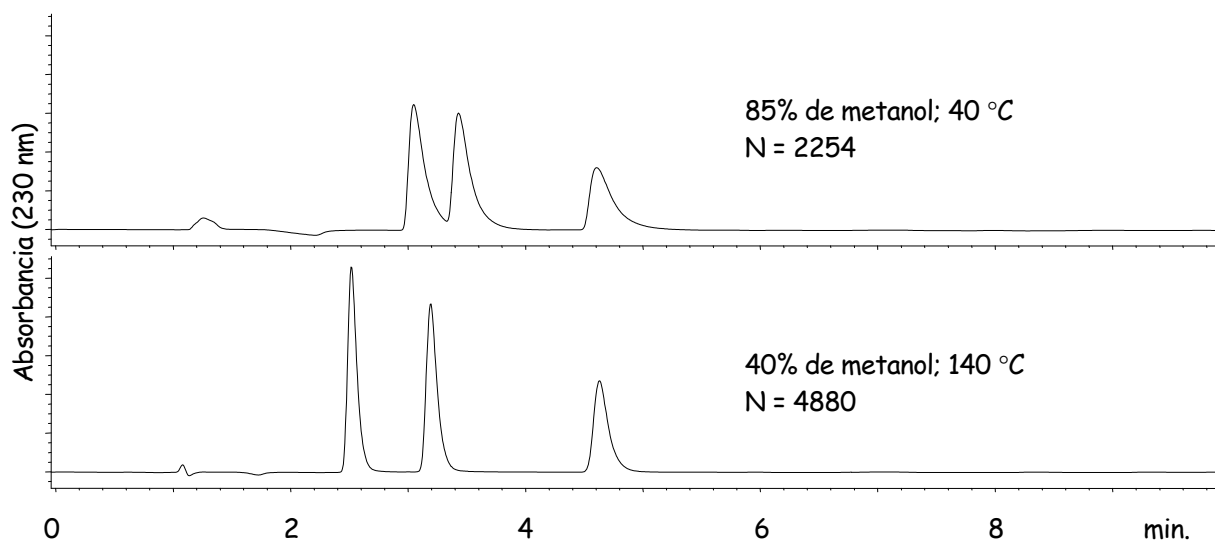


Figura 3.4-3. Influencia del % de disolvente orgánico (metanol) en la fase móvil y de la temperatura sobre la separación cromatográfica. N, número de platos de la columna.

También se ha realizado el estudio utilizando inhibidores de la catepsina B y varios flavonoides a diferentes temperaturas y porcentajes de metanol. Se ha utilizado una columna PRP-1, desarrollada para la separación de LC tanto a altas temperaturas como a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos (figura 3.4-4) muestran para la flavona (pico 2) tiempos de retención comparables, obtenidos con el 80% de metanol a 25 °C y con 10% de metanol a 185 °C, obteniéndose una mejor eficacia a altas temperaturas. De nuevo, podemos ver como se puede reducir considerablemente la cantidad de disolvente orgánico utilizando altas temperaturas para la columna. Sin embargo, en este estudio, la columna PRP-1 muestra una relativa alta hidrofobicidad, debido a lo cual, aún utilizando altas temperaturas, se hace necesario el 10% de metanol para la separación cromatográfica.

3.4.1.4. Velocidad del flujo de la fase móvil.

La velocidad del flujo es otro de los factores que puede influir en la separación cromatográfica. Para determinar su influencia en HTLC se ha realizado la separación de los tres benzoatos utilizados en los apartados anteriores, incrementado la velocidad de flujo a una temperatura fija de 140 °C. La columna utilizada ha sido la DiamondBond®-C₁₈. Como se puede comprobar en la figura 3.4-5, el incremento en el flujo desde 0,6 hasta 3,0 mL/min. produce una disminución de los tiempos de retención superiores al 80%, aunque también puede observarse una pequeña disminución en la intensidad de los picos.

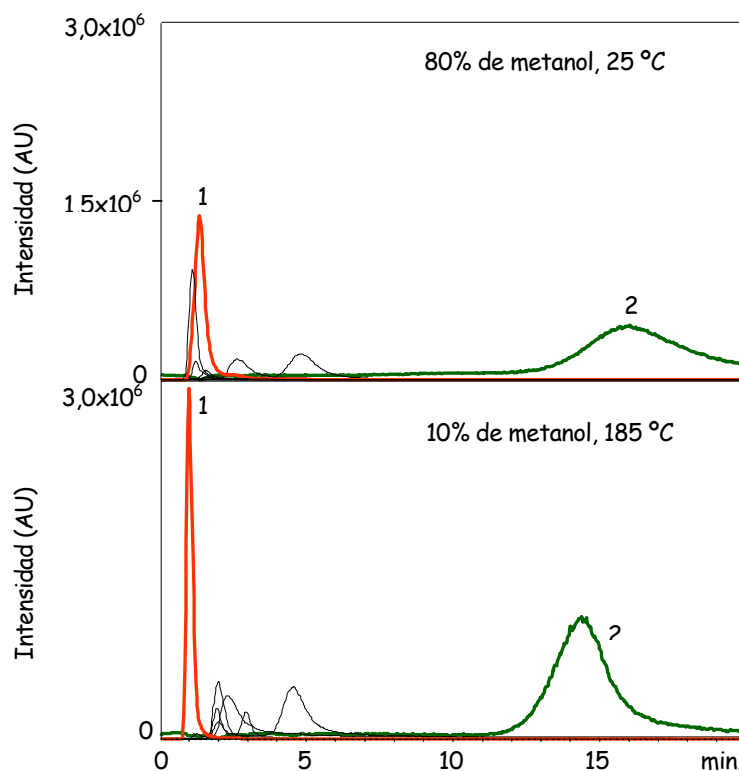


Figura 3.4-4. Influencia de la temperatura sobre el porcentaje de metanol en la separación cromatográfica de una mezcla de flavonoides y de inhibidores de la catepsina B. Se muestran el primer (1. E-64) y el último compuesto que eluyen (2. Flavona). Volumen de inyección, 2 μ L; Flujo, 125 μ L/min.; Columna PRP-1. (El cromatograma de la flavona ha sido ampliado 5 veces)

3.4.2. Estudio de la bioactividad mediante acoplamiento de HTLC con ESI-MS en flujo continuo.

3.4.2.1. Estudio de la bioactividad de la catepsina B mediante acoplamiento de HTLC con ESI-MS en flujo continuo.

Para poder determinar tanto las características químicas como la actividad biológica de las muestras a estudiar, se ha acoplado la HTLC con ESI-MS, sistema que ha sido optimizado para la realización de ensayos de bioactividad (de Boer y col., 2004).

El ensayo enzimático se basa en la detección de los productos formados por una enzima a partir de un sustrato, debido a la reacción enzimática. Para hacer este estudio se ha utilizado como enzima la catepsina B, por su importancia, puesto que forma parte de algunos procesos fisiológicos y patológicos, como el cáncer y la metástasis (Herszenyi y col., 2000). La reacción enzima-sustrato se realiza en una solución tampón de sales que se utilizan de forma rutinaria en ESI-MS.

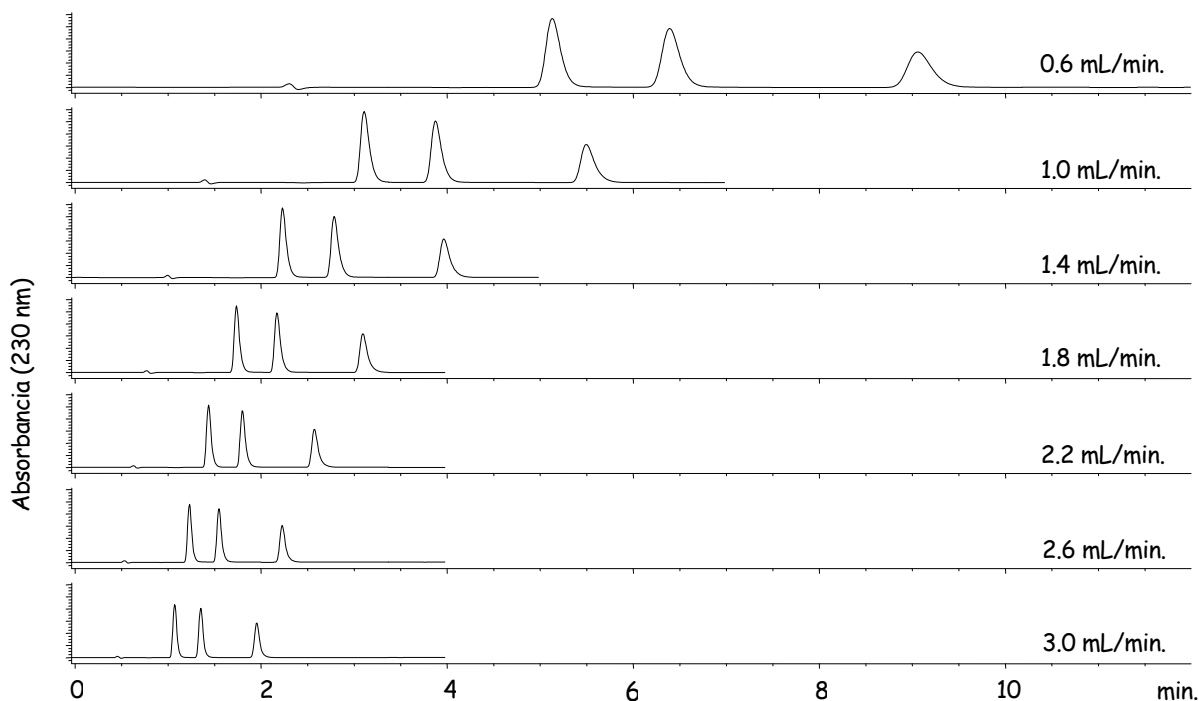


Figura 3.4-5. Influencia de la velocidad del flujo en la separación cromatográfica. Temperatura de la columna 140 °C.

Los experimentos realizados han demostrado que la catepsina B es activa en una solución, a pH 7,0, que contiene, solamente, una sal volátil (formiato amónico) y ditioeritritol (DTE), el cual es necesario para la activación de la enzima (de Boer y col., 2004), por lo que, tanto a la solución de enzima como a la de sustrato se le adiciona DTE para activar la catepsina B, siendo adicionada a esta última para disolver al sustrato en las mismas condiciones que a la enzima. La verificación de todo el sistema se ha realizado en continuo, mediante la respuesta de dos compuestos de monitorización del sistema (SMC), el cAMP y la biotina, mostrando la estabilidad del sistema durante las mediciones (cromatograma D, figura 3.4-6). El sistema de flujo continuo se basa en que la reacción enzimática se produce de forma continua, al adicionar el eluido de la columna a la enzima y al sustrato. La catepsina B hidroliza al sustrato Z-Phe-Arg-AMC dando lugar a los productos Z-Phe-Arg-OH ó Z-Phe-Arg-OCH₃ y AMC, los cuales se detectan en continuo por ESI-MS mediante la relación m/z de 456, 470 y 176, respectivamente. La fuente de ionización por electrospray (ESI), es utilizada como interfase para la ionización de los compuestos. Para conseguir que la muestra alcance la forma de gota fina, spray, y para la desolvatación, se ha utilizado un flujo de gas N₂ a presión atmosférica. La cantidad de producto formado se monitoriza mediante ESI-MS o UV. La enzima y el sustrato han sido acoplados al sistema mediante sendos superloops.

En este sistema de flujo continuo, la solución portadora de la muestra se mezcla con la enzima y con el sustrato, diluyendo la concentración de dicha solución a la mitad. Ha sido necesario optimizar el flujo de la enzima y del sustrato para obtener los mejores resultados. Los compuestos (inhibidores) que se inyectan en el sistema reaccionan con la enzima, mezclándose en el primer biorreactor. Después de mezclarse, los compuestos en reacción entran en el segundo biorreactor, en el cual se mezclan con el sustrato. Ante la ausencia de inhibidores se produce una continua ruptura del sustrato por parte de la enzima. Sin embargo, si en la muestra se encuentra algún compuesto inhibidor, en el primer biorreactor se producirá el bloqueo de la enzima, dando lugar a una disminución de la actividad enzimática, cuya consecuencia será una disminución temporal en la hidrólisis del sustrato, produciéndose un pico negativo en la señal detectada. Por tanto, la bioactividad que presenta el eluido de la columna se detecta como un pico negativo en la señal de los productos, debido a la inhibición de la enzima producida por los inhibidores presentes en la muestra inyectada en la columna.

La aplicabilidad de la HTLC al ensayo de bioactividad depende de la separación de los productos de la mezcla inicial, de la forma de los picos y del enfriamiento adecuado del eluido. Para estudiar la aplicabilidad del sistema, se han estudiado tres inhibidores (CA-074, E-64 y

leupeptina) de la enzima, inyectándose y separándose isotérmicamente a diferentes temperaturas, con tan sólo un 10% de metanol en la fase móvil (figura 3.4-6). El acoplamiento de la HTLC con el ensayo enzimático no ha dado lugar a ningún efecto significativo sobre la actividad de la enzima. La intensidad de los productos de la reacción ha sido suficiente para la detección del ensayo de bioactividad (cromatogramas A-C, figura 3.4-6), como puede observarse claramente en los tres picos negativos de la figura 3.4-6.

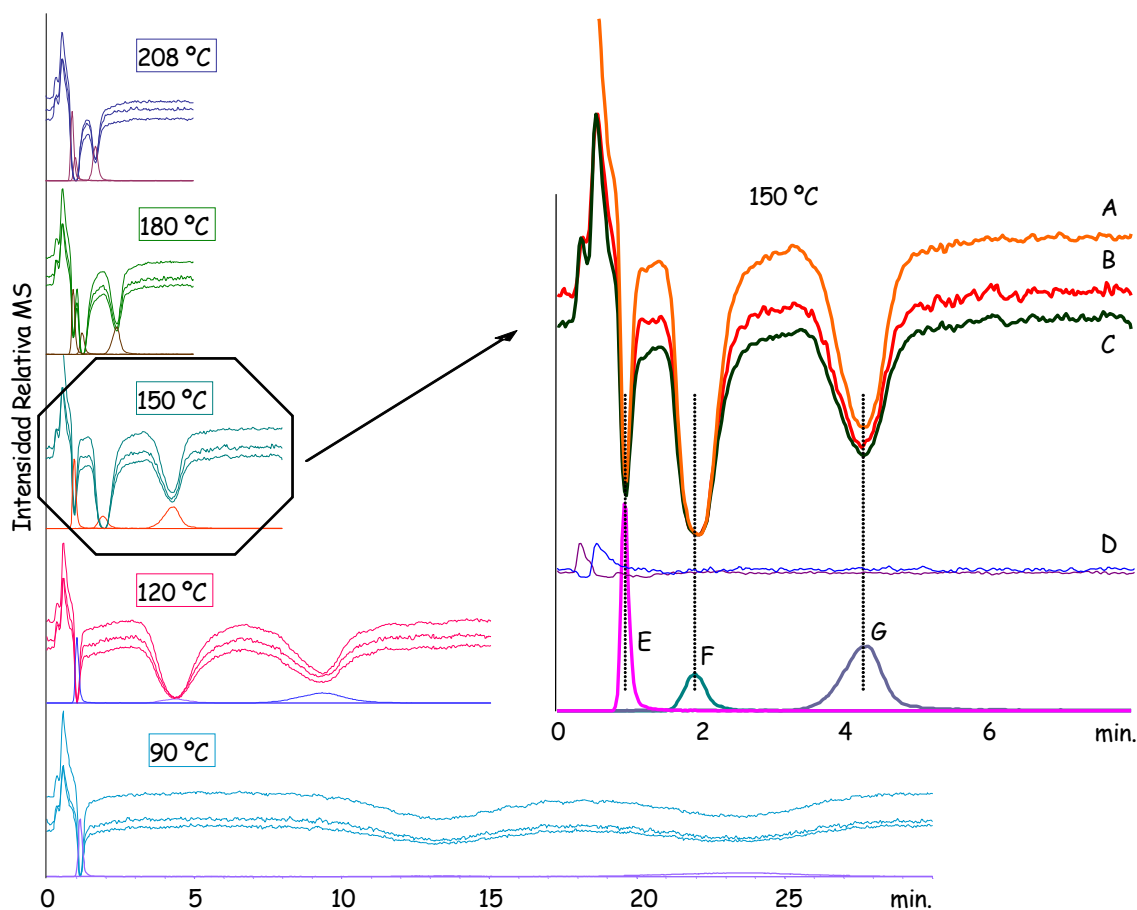


Figura 3.4-6. Ensayos de los inhibidores de la catepsina B, CA-074 (65 μ M), E-64 (55 μ M), y leupeptina (65 μ M) a diferentes temperaturas, mediante un sistema de flujo continuo con HTLC. Cromatograma correspondiente a la masa del producto AMC (A), del producto Z-Phe-Arg-OCH₃ (B), del producto Z-Phe-Arg-OH (C), de los SMCs (D), del inhibidor E-64 (E); del inhibidor CA-074 (F) y del inhibidor leupeptina (G). Volumen de inyección, 0.5 μ L; Columna, PRP-1; Velocidad de flujo de LC, 300 μ L/min.

Este ensayo bioquímico de flujo continuo acoplado a ESI-MS, permite determinar simultáneamente, junto a la bioactividad, la masa molecular de los inhibidores. Los picos negativos en los cromatogramas correspondientes a las masas de los productos de la reacción enzimática presentan los mismos tiempos de retención que los picos positivos de los inhibidores (cromatogramas E-G, figura 3.4-6). En el cromatograma se puede ver la relación entre la bioactividad (A-C, figura 3.4-6) y los inhibidores (E-G, figura 3.4-6), presentando tiempos de retención y formas de picos similares. El hecho de que no se observen picos negativos para los compuestos SMC en el cromatograma, indica que los picos negativos observados en los cromatogramas de los productos se correlacionan, únicamente, con la inhibición de la enzima, puesto que los compuestos SMC indican que el sistema ha sido estable y los picos negativos no se deben a fluctuaciones de la señal. De estos resultados se puede comprobar que la separación mediante HTLC puede ser aplicada para llevar a cabo ensayos bioactivos en continuo.

3.4.2.1.a. Estudio de la influencia del gradiente de temperatura sobre el ensayo de la bioactividad, de la catepsina B, en continuo.

En HTLC, se utilizan gradientes de temperatura para reemplazar al gradiente de disolvente orgánico utilizado en RPLC y que influye en los tiempos de retención de los analitos y su selectividad. Durante el programa de temperatura, la polaridad de la fase móvil disminuye cuando se incrementa la temperatura, como se ha comentado anteriormente en la introducción. Se ha estudiado el potencial del gradiente de temperatura sobre el ensayo bioquímico, utilizando diferentes temperaturas y velocidades de calentamiento. Para ello se ha utilizado una mezcla de compuestos constituida por tres flavonoides y por tres inhibidores de la enzima catepsina B, para obtener un cromatograma que permita alcanzar conclusiones claras del efecto del gradiente de temperatura sobre la separación y para demostrar que la selectividad del bioensayo en el sistema HTLC-ESI-MS no resulta afectada (figura 3.4-6).

La aplicación de un método de HTLC isotérmico a 180 °C ha dado lugar a la detección de los picos de los compuestos inhibidores (picos 1-3, figura 3.4-6A) en el cromatograma correspondiente a las masas de los productos (pico 4, figura 3.4-6A). Sin embargo, la resolución de los compuestos menos polares, como la flavona (pico 5, figura 3.4-6A), ha sido más pobre. La separación cromatográfica de todos los compuestos es mejorada, significativamente, utilizando un gradiente de temperatura (figura 3.4-6B). La eficacia se incrementa cambiando la temperatura inicial (figura 3.4-6C), la velocidad de flujo del sistema (figura 3.4-6D) ó la velocidad del gradiente de temperatura (figuras 3.4-6E-F). Los tiempos de retención son un tercio, cuando se aplica un

gradiente que se mantiene durante un minuto a 150 °C y sube, a 30 °C/min, hasta 208 °C, manteniéndolo durante 10 minutos, con un flujo de 300 µL/min (figura 3.4-6F), respecto a los que se obtienen con el programa isotérmico a 180 °C y un flujo de 150 µL/min (figura 3.4-6A).

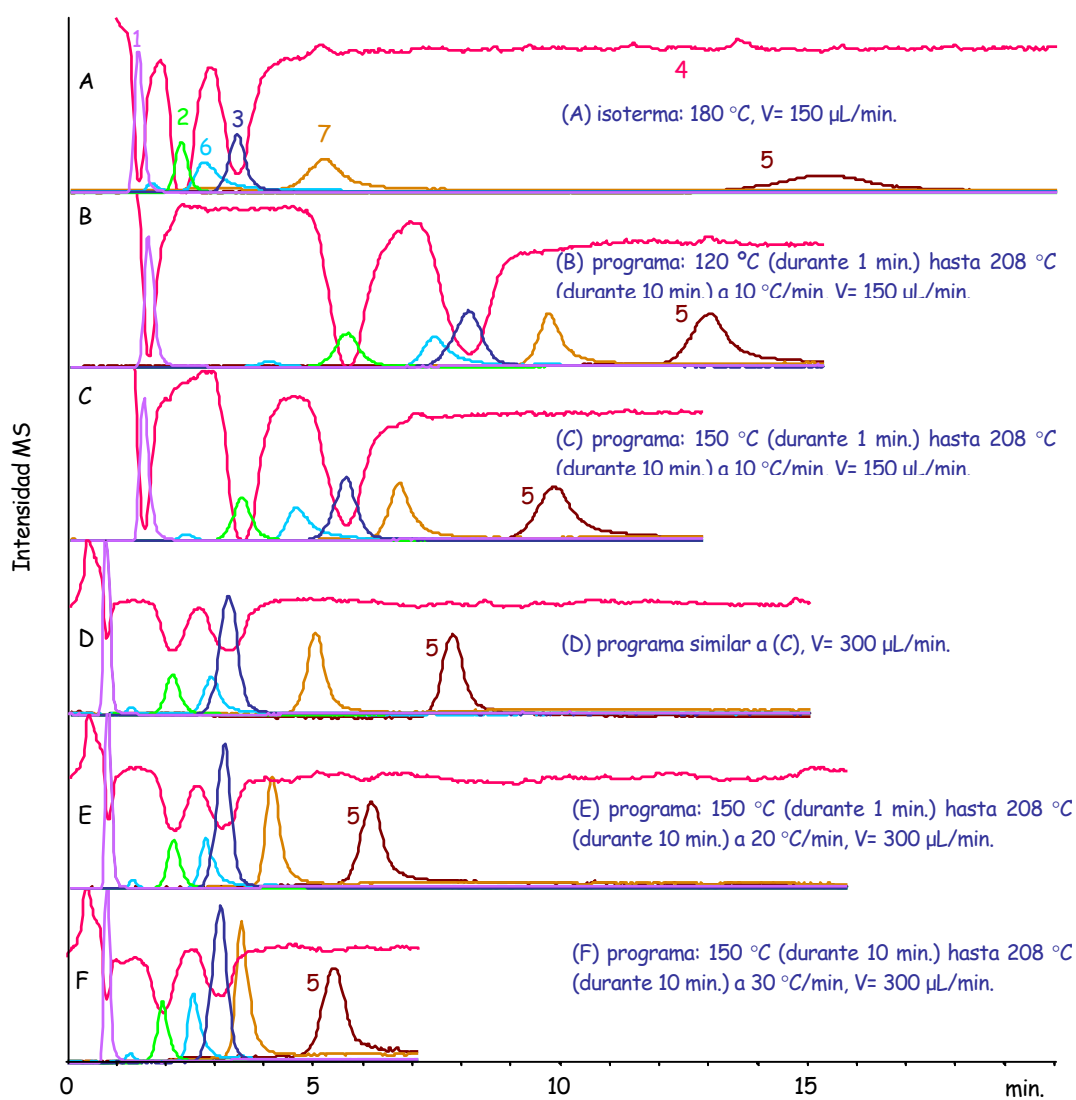


Figura 3.4-6. Muestreo para determinar la inhibición de la enzima Cathepsina B, utilizando programa de temperatura. (1) CA-074 (50 µM), (2) E-64 (50 µM), (3) leupeptina (50 µM), (5) flavona (30 µM), (6) genisteína (100 µM) y (7) genistina (50 µM). Volumen de inyección, 1 µl; Columna, 0.8 mm PRP-1 (Para mayor claridad de la figura, solo se muestra el cromatograma de uno de los productos de la reacción (4) (producto AMC) en cada cromatograma. Velocidad de flujo (V)

Con estos cambios, la actividad enzimática ha podido ser detectada sin ningún problema, lo cual demuestra el potencial del gradiente de temperatura en la HTLC. Se han podido utilizar velocidades de flujo relativamente altas, puesto que se produce una disminución de la presión del sistema debido al incremento de la temperatura. Además, con un gradiente convencional de disolvente orgánico a temperatura ambiente, como se utiliza en RPLC, la actividad enzimática cambia durante el análisis, mientras que en el caso de la HTLC el disolvente utilizado en el ensayo bioquímico siempre tiene la misma composición. Una ventaja añadida sobre el gradiente en RPLC, es el equilibrado más rápido de la columna para tenerla preparada para el siguiente análisis, lo cual da lugar a la reducción en el tiempo de los mismos.

3.4.2.1.b. Sensibilidad del sistema en el ensayo bioquímico con catepsina B.

La fiabilidad del sistema de cromatografía de alta temperatura acoplado depende, no solo de la separación, sino también de la conservación de la actividad biológica de los inhibidores. Durante el ensayo, las muestras se exponen a altas temperaturas durante un tiempo que depende de la polaridad de los compuestos y de la fase móvil. La influencia de la temperatura, sobre el ensayo bioquímico, se ha determinado realizando una curva de calibrado del inhibidor E-64. Se han obtenido diferentes curvas, después de utilizar varias concentraciones (100 nM-100 μ M), inyectándose cada una de ellas por duplicado en modo directo, en un sistema similar al de la figura 2.3-3 de materiales y métodos, pero sin utilizar columna, a 30 y 200 °C con agua como eluyente, llevado a pH 4 con ácido acético. La velocidad de flujo utilizada ha sido de 50 μ L/min, mientras que la velocidad de flujo de cada uno de los dos superloops, conteniendo enzima y sustrato, respectivamente, ha sido de 25 μ L/min.

La altura de los picos negativos obtenidos ha sido representada en función de la concentración. De la curva obtenida se extrae el IC_{50} , el cual es la concentración a la cual el inhibidor bloquea el 50% de la actividad de la enzima. Los valores encontrados han sido de 1,1 μ M para 30 °C y de 1,2 μ M para 200 °C, los cuales son una buena aproximación de los valores encontrados en la bibliografía, determinados mediante acoplamiento en línea de HPLC y del ensayo enzimático a temperatura ambiente, utilizando el mismo sistema de detección (de Boer y col., 2004). Un dato importante es que el valor IC_{50} ha sido, prácticamente, el mismo para 30 °C y 200 °C, lo cual indica que la alta temperatura utilizada no presenta efectos negativos sobre la actividad enzimática.

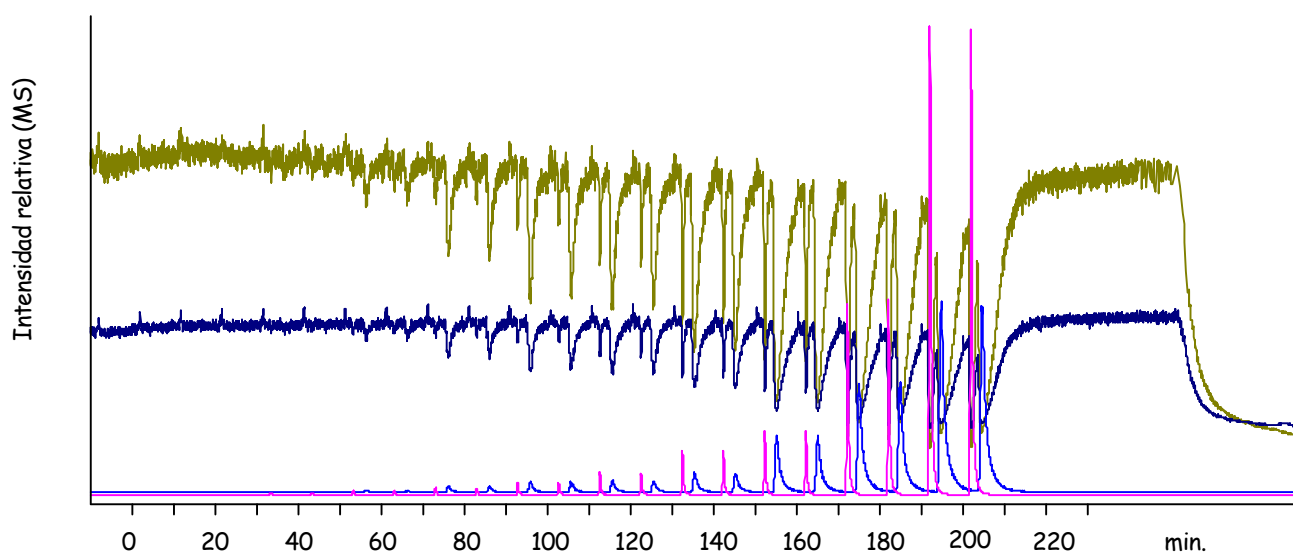


Figura 3.4-7. Determinación del IC_{50} de los inhibidores, de la catepsina B, E-64 y Leupeptina.

También se ha realizado el estudio de la influencia de la temperatura en el sistema cromatográfico con la columna PRP-1, inyectando una mezcla de compuestos formada por E-64 (100 nM-300 μ M) y leupeptina (30 nM-100 μ M), en las mismas condiciones que en la experiencia anterior, a una temperatura de 160 $^{\circ}$ C (figura 3.4-7). Los valores encontrados para el IC_{50} han sido de 18,4 μ M para E-64 y de 5,0 μ M para leupeptina. Comparándolos con los datos encontrados en la bibliografía para RPLC (de Boer y col., 2004), los valores han sido 7,7 y 4,5 veces más altos para E-64 y leupeptina, respectivamente. Estos valores pueden haber sido más altos debido, probablemente, a la diferencia en la velocidad de flujo y, por tanto, a los diferentes tiempos de reacción, al uso de una columna con menos eficacia (fabricación propia), a una mayor dilución de la muestra y/o por no utilizar áreas en los resultados. El factor de dilución calculado para el sistema de HTLC ha sido 3,5 veces más alto que para el sistema de RPLC. Puesto que la bioactividad depende de la concentración de inhibidor a un cierto tiempo, es decir, depende de la altura del pico, el aumento en la dilución del inhibidor da como resultado, en general, un mayor valor para el índice IC_{50} . Esta dilución es, parcialmente, causada por un mayor volumen extra de la columna, debido a los tubos de precalentamiento y de enfriamiento (debido a la enzima y al sustrato). No obstante, los valores demuestran la viabilidad del sistema de flujo continuo de la HTLC para llevar a cabo ensayos de bioactividad.

Hay que indicar que no se han encontrado en la bibliografía valores de IC_{50} de los inhibidores E-64 y leupeptina realizados mediante ensayos espectrofotométricos, con lo cual no se pueden comparar los resultados entre ambos métodos.

3.4.2.2. Estudio de la bioactividad de la ECA mediante acoplamiento de HTLC con ESI-MS en flujo continuo.

Una vez comprobada la viabilidad del estudio de la bioactividad de la catepsina B mediante acoplamiento de HTLC con ESI-MS en flujo continuo, nos hemos planteado llevar a cabo un estudio semejante pero utilizando la ECA. En la reacción enzimática de la ECA es necesario utilizar altas concentraciones de sales, lo cual no es compatible con el equipo de masas. Para evitar tener que realizar modificaciones en el sistema, se ha intentado realizar la reacción enzimática y preparación de la enzima bajo condiciones compatibles con MS. Sin embargo, la enzima no funciona correctamente cuando se utilizan tampones volátiles, así que se ha optado por derivar parte del flujo postcolumna hacia un detector de fluorescencia para detectar los picos negativos debido a la inhibición, mientras que el resto del flujo se dirige hacia el MS (figura 4 de materiales y métodos) obteniéndose los picos debidos a los inhibidores para obtener la información estructural de los compuestos responsables de la inhibición. Debido a que se han utilizado dos detectores diferentes para este ensayo, se ha tenido que realizar una optimización del sistema para relacionar los tiempos de retención entre ambos.

El sistema se ha optimizado para realizar ensayos de bioactividad. El ensayo enzimático se basa en los mismos fundamentos comentados, anteriormente, para la catepsina B. En este caso, la enzima hidroliza al sustrato Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH en los productos Abz-Gly y p-nitro-Phe-Pro-OH, siendo el primero de los productos detectado en continuo por fluorescencia (λ_{exc} y λ_{emi} de 320 y 420 nm, respectivamente), apreciándose un pico negativo cuando se produce la inhibición de la enzima (ECA) por parte del inhibidor (captopril), la cual es detectada continuamente en el MS.

Se ha estudiado la aplicabilidad del sistema modificado, realizando una curva de calibrado del inhibidor (captopril), con una temperatura de columna de 140 °C y utilizando para la reacción enzimática una temperatura de 49 °C. Se han obtenido diferentes curvas después de utilizar varias concentraciones de inhibidor (100 nM-70 μ M), inyectándose cada una de ellas por duplicado (figura 3.4-8). La velocidad de flujo utilizada ha sido de 150 μ L/min, siendo 100 μ L/min

derivados hacia el MS, mientras que la velocidad de flujo de cada uno de los dos superloops, conteniendo enzima y sustrato, ha sido de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La altura de los picos negativos obtenidos se ha representado en función de la concentración, al igual que en el apartado anterior. De la curva obtenida se obtiene el IC_{50} y el valor encontrado es de 3,4 μM . Este valor es bastante diferente de los valores encontrados en la bibliografía medidos espectrofotométricamente y que varían entre 0,007 y 0,003 μM (Mullally y col., 1997; Chen y col., 2007; Tsai y col., 2006), lo cual puede deberse, de nuevo, a los mismos motivos aportados para los inhibidores de la catepsina B. A la vista de los resultados, parece que el ensayo con la catepsina B ha ido mucho mejor que con la ECA. Sin embargo, tanto los resultados obtenidos en este estudio como los de la bibliografía tenidos en cuenta para la catepsina B han sido realizados mediante sistemas similares, utilizando sistemas cromatográficos y no se han encontrado estudios de inhibición de la catepsina B realizados espectrofotométricamente, con los inhibidores utilizados en este estudio. Por el contrario, los resultados obtenidos para el ensayo de la ECA se han obtenido mediante diferentes tipos de ensayos (cromatografía líquida de alta temperatura en nuestro caso y ensayo espectrofotométrico en la bibliografía). Debido a esto no se puede hacer una valoración de los dos ensayos de forma conjunta. De hecho, como se ha mencionado anteriormente, en la bibliografía se han encontrado valores diferentes para el IC_{50} del captopril, incluso determinados mediante ensayos similares. El hecho de que existan estas diferencias no impide que, en el caso de utilizar muestras reales en las mismas condiciones que las del ensayo de captopril, podemos obtener resultados validos comparándolos con los del captopril.

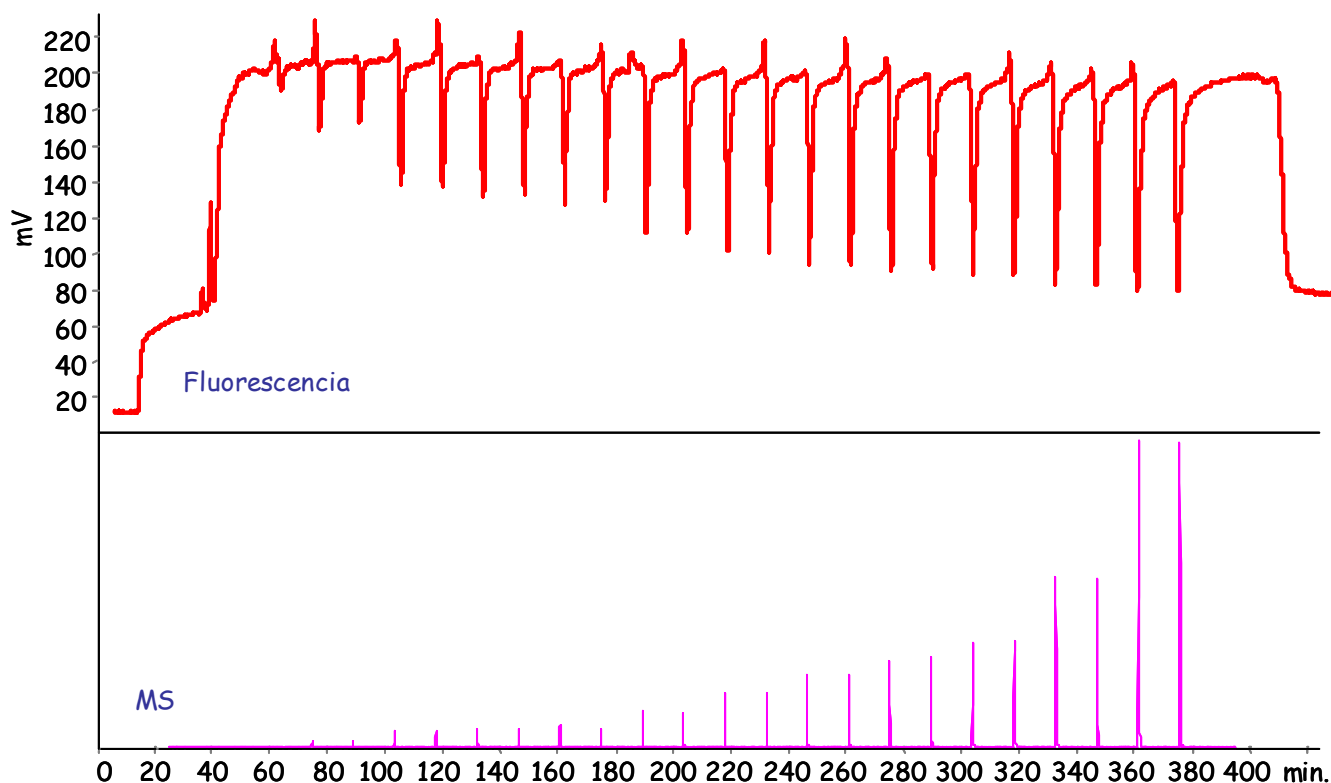


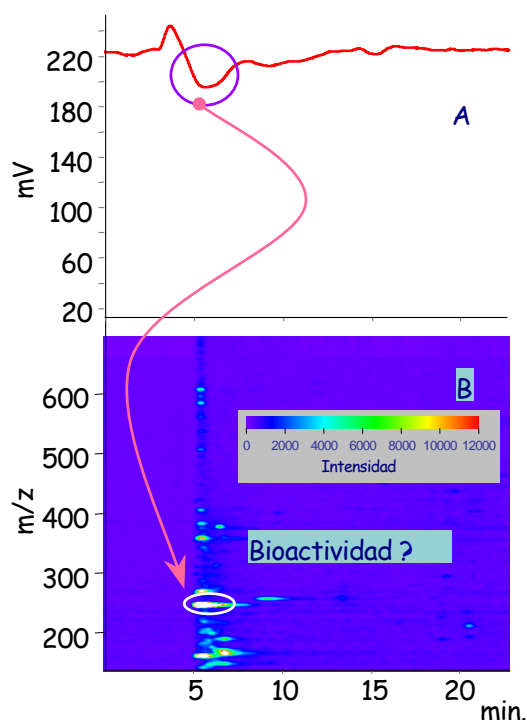
Figura 3.4-8. Determinación del IC_{50} del captopril para la inhibición de la ECA

3.4.2.3. Ensayo de bioactividad de inhibidores de la ECA en un autolisado de levadura vínica.

Mediante el sistema modificado, descrito anteriormente, se ha pretendido detectar inhibidores de la ECA que se encuentren presentes en una muestra de autolisado de una levadura vínica en condiciones de autólisis acelerada. En este ensayo se ha utilizado un gradiente de temperatura que se inicia a 40 °C durante 5 minutos y llega hasta los 140 °C, a 20 °C/min. En la figura 3.4-9a se muestra el cromatograma de fluorescencia correspondiente a los productos de la reacción enzimática, representados como un pico negativo. La identificación de las masas se realiza en el cromatograma tridimensional (figura 3.4-9b), el cual muestra la relación masa/carga en función de los tiempos de retención. El pico negativo es comparado con los picos que se observan al mismo tiempo de retención en el cromatograma tridimensional, detectándose a dicho tiempo la elución de muchos de los compuestos presentes en el autolisado, lo cual dificulta la determinación de la relación m/z del compuesto responsable de la inhibición y muestra la complejidad de la muestra. Este resultado también nos indica que, aunque la HTLC es un

potente método de separación, para esta muestra no se ha obtenido la suficiente resolución en la separación, siendo necesario mejorar tanto las condiciones de la reacción enzimática como las cromatográficas. Sin embargo, si se puede presagiar un gran futuro para esta técnica cromatográfica.

Figura 3.4-9. Ensayo de un autolisado de vino; (a) Cromatograma de fluorescencia del producto Abz-Gly; (b) Cromatograma tridimensional de MS; volumen de inyección, 5 μ L; Columna, 0.8 mm PRP-1; gradiente de temperatura: 40 °C (durante 1 min.) hasta 140 °C a 20 °C/min; velocidad de flujo LC 150 μ L/min.



3.4.3. Resumen de los principales resultados obtenidos del desarrollo de un método de cromatografía de líquidos de alta temperatura para el estudio on-line de compuestos bioactivos.

El estudio de la influencia de la composición de la fase móvil, de la estabilidad térmica del relleno de la columna, de la temperatura de la columna y de la velocidad del flujo de la fase móvil sobre la separación cromatográfica ha permitido optimizar un sistema de cromatografía líquida de alta temperatura para la separación de muestras complejas.

El sistema optimizado, acoplado con ESI-MS, ha permitido determinar *on line* la bioactividad de la catepsina B bajo diferentes condiciones de temperatura de la columna y

velocidad del flujo de la fase móvil. Una vez comprobada la viabilidad del sistema para los ensayos enzimáticos, se ha realizado el ensayo de la inhibición de la ECA con captopril, después de realizar una modificación del sistema. El método se ha aplicado a la determinación de la actividad IECA de un autolisado de una levadura vínica en un medio modelo. Aunque los resultados no han sido todo lo satisfactorios que se esperaban, debido a las características de la muestra, se ha podido comprobar que la HTLC acoplada a ESI-MS es una técnica poderosa para la separación de técnicas complejas y el estudio de bioactividad en línea.

Conclusiones

4. CONCLUSIONES

Estudio de la fracción nitrogenada de los vinos tintos

1. Durante la fermentación maloláctica de los vinos solo se produce una ligera reducción en el contenido de aminoácidos libres, probablemente por la liberación de aminoácidos al medio por la actividad proteásica de las bacterias ácido lácticas y de las levaduras. Durante el envejecimiento de los vinos tintos con lías, se liberan aminoácidos por autólisis de levaduras y bacterias, siendo mayor en los vinos envejecidos con lías y agitados semanalmente aumentando el riesgo de formación de aminas biógenas. Estos resultados indican que en el envejecimiento de vinos con las lías es necesario utilizar una cepa de bacteria ácido láctica que no produzca aminas biógenas para evitar su formación.
2. La fracción peptídica de los vinos tintos es muy compleja y está formada, al menos en parte, por glicopéptidos procedentes de las uvas y de las levaduras. Durante la fermentación maloláctica, los péptidos disminuyen y durante el envejecimiento en barrica aumentan, siendo dicho aumento superior en los vinos que envejecen con las lías. Debido a la importancia sensorial de los péptidos, es necesario tener este hecho en consideración por la repercusión que esta tecnología de elaboración puede tener en la calidad sensorial de los vinos.

Estudio de la fracción nitrogenada de vinos espumosos de la D.O. Vinos de Madrid

3. La composición nitrogenada de los vinos espumosos estudiados depende, principalmente, de la variedad de uva y del tiempo de envejecimiento en botella. La utilización de diferentes cepas de levaduras seleccionadas para la elaboración de vinos espumosos produce vinos muy semejantes.
4. La fracción peptídica de los vinos espumosos de la variedad Malvar, al igual que la del vino tinto estudiada, es muy compleja y está formada por glicopéptidos procedentes tanto de las uvas como de las levaduras. Los péptidos disminuyen después de la segunda fermentación, manteniéndose constantes o aumentado, posteriormente, llegando a alcanzar, a los doce meses de envejecimiento, valores semejantes a los del vino base.

Estudio de la bioactividad de los péptidos del vino

5. En el estudio de la actividad inhibidora de angiotensina de 33 vinos comerciales blancos de mesa, espumosos y tintos, hemos comprobado que los que tienen una mayor actividad IECA son los vinos tintos y los que menos los blancos de mesa.
6. En el estudio de los cambios de la actividad IECA de los péptidos de un vino tinto durante la fermentación maloláctica y el envejecimiento en barrica, con y sin lías, hemos comprobado que la relación actividad/nitrógeno peptídico disminuye durante la fermentación maloláctica y aumenta durante el envejecimiento.
7. En el estudio de la actividad IECA de los péptidos de vinos espumosos se ha comprobado que la relación actividad/nitrógeno peptídico aumenta durante la segunda fermentación y durante el envejecimiento hasta los 9 meses, disminuyendo posteriormente.
8. En la autólisis de las levaduras en un medio vínico modelo, se liberan compuestos con actividad IACE. La relación actividad/nitrógeno peptídico aumenta hasta las 121 horas, disminuyendo posteriormente. Se ha comprobado así mismo que los péptidos de los autolisados tienen además. Esta actividad también aumenta hasta las 121 horas y disminuye posteriormente.
9. Tanto en los vinos estudiados como en los autolisados de levaduras, las fracciones peptídicas con mayor actividad IACE es la fracción que contiene los péptidos menos polares.
10. Se han propuesto de forma tentativa 5 péptidos con actividad IECA, cuatro de ellos aislados de un vino tinto, WVP, SFP, SWF y SPWR y uno de un vino espumoso, DPPPWG. Todos los péptidos son, probablemente, glicopéptidos.

Desarrollo de un método de cromatografía de líquidos de alta temperatura para el estudio on-line de compuestos bioactivos

11. Mediante la optimización de diferentes variables cromatográficas, se ha desarrollado un método de cromatografía de líquidos de alta temperatura que permite la separación de mezclas complejas. El sistema optimizado, acoplado con ESI-MS, ha permitido determinar on line la bioactividad de la catepsina B y la actividad IECA de un producto comercial. En la aplicación del método a la determinación de la actividad IECA de un autolisado de una levadura vínica en un medio modelo y, aunque los resultados no han sido totalmente satisfactorios, se ha podido comprobar que la HTLC acoplada a ESI-MS es una técnica poderosa para la separación de mezclas complejas y el estudio de bioactividad en línea.

Bibliografia

5. BIBLIOGRAFÍA.

- Acedo M.I.**, Pueyo E., Polo M.C. Preliminary Studies on Peptides in Wine by HPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1994**, 45 (2), 167-172.
- Agenbach W.A.** A Study of Must Nitrogen Content in Relation to Incomplete Fermentations, Yeast Production and Fermentation Activity. *South African Society of Enology and Viticulture*, **1977**, 66-87.
- Alcaide-Hidalgo J.M.**, Moreno-Arribas M.V., Martín-Álvarez P.J., Polo M.C. Influence of Malolactic Fermentation, Postfermentative Treatments and Ageing with Lees on Nitrogen Compounds of Red Wines. *Food Chemistry*, **2007**, 103 (2), 572-581.
- Alexandre H.**, Costello P.J., Remize F., Guzzo J., Guilloux-Benatier M. *Saccharomyces Cerevisiae* - *Oenococcus Oeni* Interactions in Wine. Current Knowledge and Perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, **2004**, 93 (2), 141-154.
- Arena M.E.**, Saguir F.M., Manca de Nadra M.C. Arginine Dihydrolase Pathway in *Lactobacillus plantarum* From Orange. *International Journal of Food Microbiology*, **1999a**, 47 (3), 203-209.
- Arena M.E.**, Saguir F.M., Manca de Nadra M.C. Arginine, Citrulline and Ornithine Metabolism by Lactic Acid Bacteria From Wine. *International Journal of Food Microbiology*, **1999b**, 52 (3), 155-161.
- Ari' Izumi K.**, Suzuki Y., Kato I., Yagi Y., Otsuka K., Sato M. Winemaking From Kosu Variety by the Sur Lie Method: Change in the Content of Nitrogen Compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1994**, 45 (3), 312-318.
- Ashar M.N.**, Chand R. Antihypertensive Peptides Purified From Milks Fermented with *Lactobacillus Delbrueckii ssp Bulgaricus*. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, **2004**, 59 (1-2), 14-17.
- Bartolomé B.**, Moreno-Arribas M.V., Pueyo E., Polo M.C. On-Line HPLC Photodiode Array Detection and OPA Derivatization for Partial Identification of Small Peptides From White Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45 (9), 3374-3381.
- Bartrá E.** Aspectos Microbiológicos de la Elaboración del Cava, *Microbiología SEM*, **1995**, 11, 43-50.
- Bauza T.**, Blaise A., Teissedre P.L., Cabanis J.C., Kanny G., Moneret-Vautrin D.A., Daumas F. Biogenic Amines: Metabolism and Toxicity. *Bulletin de L' O.I.V.* **1995**, 68 (767-768), 42-67.

- Belitz H.D.**, Grosch W. Food chemistry. Springer-verlag, New York, **1986**, pag. 26.
- Bellamy W.**, Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. Identification of the Bactericidal Domain of Lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1121 (1-2), 130-136.
- Bonfiglio R.**, King R.C., Olah T.V., Merkle K. The Effects of Sample Preparation Methods on the Variability of the Electrospray Ionization Response for Model Drug Compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1999**, 13 (12), 1175-1185.
- Bover-Cid S.**, Izquierdo Pulido M., Mariné Font A., Vidal Carou M.C. Biogenic Mono-, di- and Polyamine Contents in Spanish Wines and Influence of a Limited Irrigation. *Food Chemistry*, **2005**, 96, 43-47.
- Bradford M.M.**, Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **1976**, 72 (1-2), 248-254.
- Bray T.M.**, Dietary Antioxidants and Assessment of Oxidative Stress. *Nutrition*, **2000**, 16 (7-8), 578-581.
- Bünning P.**, Holmquist B., Riordan J.F. Functional Residues at the Active Site of Angiotensin Converting Enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1978**, 83 (4), 1442-1449.
- Cáceres I.**, Barahona F., Polo C. El análisis íntegro de los vinos. IV. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **1986**, (5-6), 141-152.
- Cáceres I.**, Polo M.C., Cabezudo M.D. El análisis íntegro de los vinos. V. La fracción nitrogenada. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **1987**, (3-4), 123-128.
- Caessens P.W.J.R.**, Gruppen H., Visser S., van Aken G.A., Voragen A.G.J. Plasmin Hydrolysis of Beta-Casein: Foaming and Emulsifying Properties of the Fractionated Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45 (8) 2935-2941.
- Caldwell P.R.B.**, Seegal B.C., Hsu K.C., Das M., Soffer R.L. Angiotensin-Converting Enzyme - Vascular Endothelial Localization. *Science*, **1976**, 191 (4231), 1050-1051.
- Casella M.L.A.**, Whitaker J.T. Enzymatically and Chemically Modified Zein for Improvement of Functional Properties. *Journal of Food Biochemistry*, **1990**, 14 (6), 453-475.
- Castino M.** Evaluation des Colloides Glucidiques du Vin. *Bulletin de l' O.I.V*, 73, 1985.

- Chan K.M.**, Decker E.A. Endogenous Skeletal-Muscle Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1994**, 34 (4), 403-426.
- Charpentier C.**, Aussenac J., Charpentier M., Prome J.C., Duteurtre B., Feuillat M. Release of Nucleotides and Nucleosides During Yeast Autolysis: Kinetics and Potential Impact on Flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53 (8), 3000-3007.
- Charpentier C.**, Dos Santos A.M., Feuillat M. Release of Macromolecules by *Saccharomyces Cerevisiae* During Ageing of French Flor Sherry Wine "Vin Jaune". *International Journal of Food Microbiology*, **2004**, 96, 253-262.
- Chen H.**, Horvath C. High-Speed High-Performance Liquid-Chromatography of Peptides and Proteins. *Journal of Chromatography A*, **1995**, 705 (1), 3-20.
- Chen H.M.**, Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K. Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated From Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44 (9), 2619-2623.
- Chen H.M.**, Muramoto K., Yamauchi F. Structural Analysis of Antioxidative Peptides From Soybean Beta-Conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1995**, 43 (3), 574-578.
- Chen R.F.**, Scott C., Trepman E. Fluorescence Properties of Ortho-Phthaldialdehyde Derivatives of Amino-Acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1979**, 576 (2), 440-455.
- Chen S.J.**, Chang C.T., Chung Y.C., Chou S.T. Studies on the Inhibitory Effect of *Graptopetalum Paraguayense* E. Walther Extracts on the Angiotensin Converting Enzyme. *Food Chemistry*, **2007**, 100 (3), 1032-1036.
- Cheung H.S.**, Wang F.L., Ondetti M.A., Sabo E.F., Cushman D.W. Binding of Peptide Substrates and Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme - Importance of the C-terminal Dipeptide Sequence. *Journal of Biological Chemistry*, **1980**, 225 (2), 401-407.
- Claessens H.A.**, van Straten M.A. Review on the Chemical and Thermal Stability of Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1060 (1-2), 23-41.
- Cliffe A. J.**, Law B. Peptide Composition of Enzyme-Treated Cheddar Cheese Slurries, Determined by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. *Food Chemistry*, **1990**, 36, 73-80.
- Colagrande O.**, Silva A. *Indus. Bevande*, **1981**, 55, 349.

- Cooper K.A.**, Chopra M., Thurnham D.I. Wine Polyphenols and Promotion of Cardiac Health. *Nutrition Research Reviews*, **2004**, 17 (1), 111-129.
- Cushman D.W.**, Cheung H.S. Spectrophotometric Assay and Properties of Angiotensin-Converting Enzyme of Rabbit Lung. *Biochemical Pharmacology*, **1971**, 20 (7), 1637-1648.
- Das M.**, Soffer R. Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme. Structural and Catalytic Properties, **1975**, 250 (17), 6762-6768.
- Dávalos A.**, Gómez-Cordoves C., Bartolomé B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52 (1), 48-54).
- Davis C.R.**, Wibowo D. Fleet G.H., Lee T.H. Properties of Wine Lactic-Acid Bacteria. Their Potential Enological Significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1988**, 39 (2), 137-142.
- Davis C.R.**, Wibowo D.J., Lee T.H., Fleet G.H. Growth and Metabolism of Lactic-Acid Bacteria During and After Malolactic Fermentation of Wines at Different pH. *Applied and Environmental Microbiology*, **1986**, 51 (3), 539-545.
- de Boer A.R.**, Letzel T., van Elswijk D.A., Lingeman H., Niessen W.M.A., Irth H. On-Line Coupling of High-Performance Liquid Chromatography to a Continuous-Flow Enzyme Assay Based on Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2004**, 76 (11), 3155-3161.
- de la Presa-Owens C.**, Lamuela-Raventós R.M., Buxaderas S., De la Torre-Boronat M.C. Characterization of Macabeo, Xarel.lo, and Parellada White Wines From the Penedès Region II. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1995**, 46, 529-541.
- de Person M.**, Sevestre A., Chaimbault P., Perrot L., Duchiron F., Elfakir C. Characterization of Low-Molecular Weight Peptides in Champagne Wine by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 520, 149-158.
- de Revel G.**, Martín N., Pripis-Nicolau L., Lonvaud-Funel A., Bertrand A. Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 4003-4008.
- Delfini C.** Ability of Wine Malolactic Bacteria to Produce Histamine. *Sciences des Aliments*, **1989**, 9 (2), 413-416.

- Desportes C.**, Charpentier N., Duteurtre B., Maujean F., Duchiron F. Liquid Chromatographic Fractionation of Small Peptides From Wine. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 893 (2), 281-291.
- Didelot S.**, Bordenave-Juchereau S., Rosenfeld E., Fruitier-Arnaudin I., Piot J.M., Sannier F. Preparation of Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Hydrolysates From Unsupplemented Caprine Whey Fermentation by Various Cheese Microflora. *International Dairy Journal*, **2006**, 16 (9), 976-983.
- Diplock A.T.**, Aggett P.J., Ashwell M., Borner F., Fern E.B., Roberfroid M.B. In *Functional Foods II-claims and evidence*. (Eds J. Buttriss and M. Saltmarsh), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2000**, pp 8-59.
- Dizy M.**, Polo M.C. Changes in Concentration of Nitrogenous Compounds During Fermentation of White Grape Musts at Pilot Plant Scale. *Food Science and Technology International*, **1996**, 2 (2), 87-93.
- Djordjevic N.M.**, Fowler P.W.J., Houdiere F. High Temperature and Temperature Programming in High-Performance Liquid Chromatography: Instrumental Considerations. *Journal of Microcolumn Separations*, **1999**, 11 (6), 403-413.
- Doco T.**, Vuchot P., Cheynier V., Moutounet M. Structural Modification of Wine Arabinogalactans During Aging on Lees. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2003**, 54 (3), 150-157.
- Doi E.**, Shibata D., Matoba T. Modified Colorimetric Ninhydrin Methods for Peptidase Assay. *Analytical Biochemistry*, **1981**, 118, 173-184.
- Dolan J.W.** Temperature Selectivity in Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2002**, 965 (1-2), 195-205.
- Dos Santos A.M.**, Feuillat M., Charpentier C. Flor Yeast Metabolism in a Model System Similar to Cellar Ageing of the French "Vin Jaune": Evolution of Some By-Products, Nitrogen Compounds and Polysaccharides. *Vitis*, **2000**, 39 (3), 129-134.
- Eldorrey H.A.**, Bull H.G., Iwata K., Thornberry N.A., Cordes E.H., Soffer R.L. Molecular and Catalytic Properties of Rabbit Testicular Dipeptidyl Carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **1982**, 257 (23), 14128-14133.
- Enes Dapkevicius M.L.N.**, Nout M.J.R., Rombouts F.M., Houben J.H., Wymenga W. Biogenic Amine Formation and Degradation by Potential Fish Silage Starter Microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, **2000**, 57, 107-114.

- Escot S.**, Feuillat M., Dulau L., Charpentier C. Release of Polysaccharides by Yeasts and the Influence of Released Polysaccharides on Colour Stability and Wine Astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2001**, 7, 153-159.
- Etievant P.**, Schlich P., Bouvier J.C., Symonds P., Bertrand A. Varietal and Geographic Classification of French Red Wines in Terms of Elements, Amino-Acids and Aromatic Alcohols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1988**, 45 (1), 25-41.
- Fajardo M.C.**, Simón B., Luna N., Fernández K., Hidalgo P. Presencia y Estudio del Carácter Floculante en Cepas Vínicas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Actas de la SEM. XII Congreso de Microbiología de los Alimentos*, **2000**, 1, 125.
- Farias M.E.**, Manca de Nadra M.C., Rollan G.C., Strasser de Saad A.M. Histidine Decarboxylase Activity in Lactic Acid Bacteria From Wine. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **1993**, 27, 191-199.
- Farrer K.T.H.** The Autolysis of Yeast. *Food Science Abstracts*, **1956**, 28, 1-12.
- Fernández P.A.A.**, Manca de Nadra M.C. Growth Response and Modifications of Organic Nitrogen Compounds in Pure and Mixed Cultures of Lactic Acid Bacteria From Wine. *Current Microbiology*, **2006**, 52 (2), 86-91.
- Ferreira R.B.**, Monteiro S., Picarra-Pereira M.A., Tanganho M.C., Loureiro V.B., Teixeira A.R. Characterization of the Proteins From Grapes and Wines by Immunological Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2000**, 51 (1), 22-28.
- Feuillat M.**, Bidan P., Rosier Y. Growth of Lactic Bacteria From Wine Main Nitrogen Components. *Annales de Technologie Agricole*, **1977**, 26 (4), 435-447.
- Feuillat M.**, Brillant G., Rochard J. Evidence of Exocellular Protease Production by Yeasts During Alcoholic Fermentation of Grape Must. *Connaissance Vigne et Vin*, **1980**, 14, 37-52.
- Feuillat M.**, Charpentier C. Autolysis of Yeasts in Champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1982**, 33 (1), 6-13.
- Fields S.M.**, Ye C.Q., Zhang D.D., Branch B.R., Zhang X.J., Okafo N. Superheated Water as Eluent in High-Temperature High-Performance Liquid Chromatographic Separations of Steroids on a Polymer-Coated Zirconia Column. *Journal of Chromatography A*, **2001**, 913 (1-2), 197-204.
- Fitzgerald R.J.**, Meisel H. Milk Protein-Derived Peptide Inhibitors of Angiotensin-I-Converting Enzyme. *British Journal of Nutrition*, **2000**, 84 (1), S33-S37.

- Flamini R.**, de Rosso M. Mass Spectrometry in the Analysis of Grape and Wine Proteins. Expert Review of Proteomics, **2006**, 3 (3), 321-331.
- Fornairon-Bonnefond C.**, Camarasa C., Moutounet M., Salmon J.M. New Trends on Yeast Autolysis and Wine Ageing on Lees: A Bibliographic Review. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, **2002**, 36 (2), 49-69.
- Fourcassie P.**, Makagakabindamassard E., Belarbi A., Maujean A. Growth, D-Glucose Utilization and Malolactic Fermentation by *Leuconostoc-Oenos* Strains in 18 Media Deficient in One Amino-Acid. Journal of Applied Bacteriology, **1992**, 73 (6), 489-496.
- Fujimaki M.** Importance of Peptides in Food Science. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, **1981**, 21 (3), 299-310.
- Fujimaki M.**, Yamashita M., Okazawa Y., Arai S. Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. III. Diffusible Bitter Peptides and Free Amino Acids in Peptic Hydrolysate of Soybean Protein. Journal of Food Science, **1970**, 35 (3), 215-18.
- Garvic E.** The Growth Factor and Amino Acid Requirements of the Genus *Leuconostoc*, Including *Leuconostoc paramensetereoides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. Journal of General Microbiology, **1967**, 48, 439-447.
- Gibbs B.F.**, Zougman A., Masse R., Mulligan C. Production and Characterization of Bioactive Peptides From Soy Hydrolysate and Soy-Fermented Food. Food Research International, **2004**, 37 (2), 123-131.
- Gobbetti M.**, Minervini F., Rizzello C.G. Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antimicrobial Bioactive Peptides. International Journal of Dairy Technology, **2004**, 57 (2-3), 173-188.
- Gobetti M.**, Stepaniak L., De Angelis M., Corsetti A., Di Cagno R. Latent Bioactive Peptides in Milk Proteins: Proteolytic Activation and Significance in Dairy Processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **2002**, 42 (3), 223-239.
- Gómez M.J.**, Garde S., Gaya P., Medina M., Nunez M. Relationship Between Level of Hydrophobic Peptides and Bitterness in Cheese Made From Pasteurized and Raw Milk. Journal of Dairy Research, **1997**, 64 (2), 289-297.
- Gómez-Ruiz J.A.**, Ramos M., Recio I. Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitory Activity of Peptides Isolated From Manchego Cheese. Stability Under Simulated Gastrointestinal Digestion. International Dairy Journal, **2004b**, 14 (12), 1075-1080.

- Gómez-Ruiz J.A.**, Ramos M., Recio I. Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitory Peptides in Manchego Cheeses Manufactured with Different Starter Cultures. *International Dairy Journal*, **2002**, 12, 697-706.
- Gómez-Ruiz J.A.**, Ramos M., Recio I. Identification and Formation of Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitory Peptides in Manchego Cheese by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2004a**, 1054, 269-277.
- Goncalves F.**, Heyraud A, De Pinho M.N., Rinaudo M. Characterization of White Wine Mannoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50 (21), 6097-6101.
- González de Llano D.**, Polo M.C., Ramos M. Production, Isolation and Identification of Low Molecular Mass Peptides From Blue Cheese by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Dairy Research*, **1991**, 58, 363-372.
- González Marco A.**, Ancín Azpilicueta C. Amine Concentration in Wine Stored in Bottles at Different Temperatures. *Food Chemistry*, **2006**, 99 (4), 680-685.
- Gouda K.G.M.**, Gowda L.R., Rao A.G.A., Prakash V. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived From Glycinin, the 11S Globulin of Soybean (Glycine Max). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54 (13), 4568-4573.
- Guilloux-Benatier M.**, Chassagne D. Comparison of Components Released by Fermented or Active Dried Yeasts After Aging on Lees in a Model Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 746-751.
- Guilloux-Benatier M.**, Son H.S., Bouthier S., Feuillat M. Osidasic and Peptidasic Activities in *Leuconostoc Oenos* During Bacterial Growth. Influence of Macromolecules of Yeasts. *Vitis*, **1993**, 32 (1), 51-57.
- Hawthorne S.B.**, Yang Y., Miller D.J. Extraction of Organic Pollutants From Environmental Solids with Sub- and Supercritical Water. *Analytical Chemistry*, **1994**, 66 (18), 2912-2920.
- He P.**, Yang Y. Studies on the Long-Term Thermal Stability of Stationary Phases in Subcritical Water Chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2003**, 989 (1), 55-63.
- Henick-Kling T.** Control of Malo-Lactic Fermentation in Wine: Energetics, Flavour Modification and Methods of Starter Culture Preparation. *Journal of Applied Bacteriology. Symposium Supplement*, **1995**, 79, 29S-37S.

- Herbert P.**, Cabrita M.J., Ratola N., Laureano O., Alves A. Free Aminoacids and Biogenic Amines in Wines and Musts From the Alentejo Region. Evolution of Amines During Alcoholic Fermentation and Relationship with Variety, Sub-region and Vintage. *Journal of Food Engineering*, **2005**, 66 (3), 315-322.
- Hernández T.**, Estrella I., Carlavilla D., Martín-Álvarez P.J., Moreno-Arribas M.V. Phenolic Compounds in Red Wine Subjected to Industrial Malolactic Fermentation and Ageing on Lees. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 563 (1-2), 116-125.
- Hernández-Ledesma B.**, Amigo L., Ramos M., Recio I. Application of High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to the Identification of Biologically Active Peptides Produced by Milk Fermentation and Simulated Gastrointestinal Digestion. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1049, 107-114.
- Hernández-Ledesma B.**, Martín-Álvarez P.J., Pueyo E. Assessment of the Spectrophotometric Method for Determination of Angiotensin-Converting-Enzyme Activity: Influence of the Inhibition Type. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 4175-4179.
- Hernández-Ledesma B.**, Miralles B., Amigo L., Ramos M., Recio I. Identification of Antioxidant and ACE-Inhibitory Peptides in Fermented Milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2005**, 85 (6), 1041-1048.
- Hernández-Ledesma B.**, Recio I., Ramos M., Amigo L. Preparation of Ovine and Caprine Beta-Lactoglobulin Hydrolysates with Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitory Activity. Identification of Active Peptides From Caprine Beta-Lactoglobulin Hydrolysed with Thermolysin. *International Dairy Journal*, **2002**, 12 (10), 805-812.
- Herraiz T.**, Casal V., Polo M.C. Reversed-Phase HPLC Analysis of Peptides in Standard and Dairy Samples Using on-line Absorbency and Postcolumn OPA-Fluorescence Detection. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **1994**, 199 (4), 265-269.
- Herraiz T.**, Huang Z., Ough C.S. Amino Acids and Ethyl Esters of Amino Acids in Sparkling and "Sur Lie" Wines. *Italian Journal of Food Science*, **1993c**, 5 (1), 11-20.
- Herraiz T.**, Huang Z.X., Ough C.S. 1,2,3,4-Tetrahydro-Beta-Carboline-3-Carboxylic Acid and 1-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydro-Beta-Carboline-3-Carboxylic Acid in Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1993b**, 41 (3), 455-459.
- Herraiz T.**, Ough C.S. Formation of Ethyl-Esters of Amino-Acids by Yeasts During the Alcoholic Fermentation of Grape Juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1993a**, 44 (1), 41-48.

- Herszenyi L.**, Plebani M., Carraro P., De Paoli M., Roveroni G., Cardin R., Foschia F., Tulassay Z., Naccarato R., Farinati F. Proteases in Gastrointestinal Neoplastic Diseases. *Clinica Chimica Acta*, **2000**, 291 (2), 171-187.
- Hidalgo J.** Aspectos Técnicos y Sensoriales de los Vinos Carbónicos. *Viña y Vino*, **1988**, 47, 70-78.
- Hidalgo J.** Empleo de Levaduras Aglomerantes en la Elaboración de Vinos Espumosos de Cava. *Viña y Vino*, **1986**, 36, 33-37.
- Hsu J.C.**, Heatherbell D.A. Isolation and Characterization of Soluble-Proteins in Grapes, Grape Juice, and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1987**, 38 (1), 6-10.
- Ibrahim H.R.**, Aoki T., Pellegrini A. Strategies for New Antimicrobial Proteins and Peptides: Lysozyme and Aprotinin as Model Molecules. *Current Pharmaceutical Design*, **2002**, 8 (9), 671-693.
- Inglelew W.M.**, Kunkee R.E. Factors Influencing Sluggish Fermentations of Grape Juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1985**, 36 (1), 65-76.
- Ishibashi N.**, Arita Y., Kanehisa H., Kouge K., Okai H., Fukui S. Bitterness of Leucine-Containing Peptides. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1987a**, 51 (9), 2389-2394.
- Ishibashi N.**, Kubo T., Chino M., Fukui H., Shinoda I., Kikuchi E., Okkai H., Fukui S. Taste of Proline-Containing Peptides. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1988a**, 52 (1), 95-98.
- Ishibashi N.**, Ono I., Kato K., Shigenaga T., Shinoda I., Okai H., Fukui S. Role of the Hydrophobic Amino Acid Residue in the Bitterness of Peptides. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1988b**, 52 (1), 91-94.
- Ishibashi N.**, Sadamori K., Yamamoto O., Kanehisa H., Kouge K., Kikuchi E., Okai H., Fukui S. Bitterness of Phenylalanine- and Tyrosine-Containing Peptides. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1987b**, 51 (12), 3309-3313.
- Jiménez Moreno N.**, Torrea Goñi D., Ancín Azpilicueta C. Changes in Amine Concentrations During Aging of Red Wine in Oak Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 5732-5737.

- Katayama K.**, Tomatsu M., Kawahara S., Yamauchi K., Fuchu H., Kodama Y., Kawamura Y., Muguruma M. Inhibitory Profile of Nonapeptide Derived From Porcine Troponin C Against Angiotensin I-Converting Enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 771-775.
- Kim S.K.**, Byun H.G., Park P.J., Shahidi F. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Purified From Bovine Skin Gelatin Hydrolysate. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, **2001**, 49 (6), 2992-2997.
- Kraak J.C.**, Huber J.F.K. Separation of Acidic Compounds by High-Pressure Liquid-Liquid Chromatography Involving Ion-Pair Formation. *Journal of Chromatography*, **1974**, 102, 333-351.
- Kuensch U.**, Temperli A., Mayer K. Conversion of Arginine to Ornithine During Malo-Lactic Fermentation in Red Swiss Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1974**, 25, 191-193.
- Lafon-Lafourcade S.** L'histamine des Vins. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **1975**, 22, 11-24.
- Landette J.M.**, Ferrer S., Polo L., Pardo I. Biogenic Amines in Wines From Three Spanish Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 1119-1124.
- Lattova E.**, Kapkova P., Krokhnin O., Perreault H. Method for Investigation of Oligosaccharides From Glycopeptides: Direct Determination of Glycosylation Sites in Proteins. *Analytical Chemistry*, **2006**, 78 (9), 2977-2984.
- Lee J.O.**, Kim Y.O., Shin D.H., Shin J.H., Kim E.K. Production of Selenium Peptide by Autolysis of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2006**, 16 (7), 1041-1046.
- Legay C.**, Popineau Y., Berot S., Gueguen J. Comparative Study of Enzymatic Hydrolysis of Alpha/Beta- and Gamma-Gliadins. *Nahrung*, **1997**, 41 (4), 201-207.
- Leitão M.C.**, Marques A.P., San Romão M.V. A Survey of Biogenic Amines in Commercial Portuguese Wines. *Food Control*, **2005**, 16 199-204.
- Li J.W.** Effect of Temperature on Selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography, a Thermodynamic Analysis. *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 369 (1-2), 21-37.
- Li J.W.**, Carr P.W. A Study of the Efficiency of Polybutadiene-Coated Zirconia as a Reversed-Phase Chromatographic Support. *Analytical Chemistry*, **1997c**, 69 (11), 2193-2201.

- Li J.W., Carr P.W. Effect of Temperature on the Thermodynamic Properties, Kinetic Performance, and Stability of Polybutadiene-Coated Zirconia. *Analytical Chemistry*, **1997a**, 69 (5), 837-843.
- Li J.W., Carr P.W. Evaluation of Temperature Effects on Selectivity in RPLC Separations Using Polybutadiene-Coated Zirconia. *Analytical Chemistry*, **1997b**, 69 (11), 2202-2206.
- Li J.W., Carr P.W. Retention Characteristics of Polybutadiene-Coated Zirconia and Comparison to Conventional Bonded Phases. *Analytical Chemistry*, **1996**, 68 (17), 2857-2868.
- Li J.W., Hu Y., Carr P.W. Fast Separations at Elevated Temperatures on Polybutadiene-Coated Zirconia Reversed-Phase Material. *Analytical Chemistry*, **1997d**, 69 (19), 3884-3888.
- Liu G., Djordjevic N.M., Erni F. High-Temperature Open-Tubular Capillary Column Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, **1992a**, 592, 239-247.
- Liu G., Djordjevic N.M., Erni F. Reversed- and Normal-Phase Separations by High-Temperature Open-Tubular Column Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, **1992b**, 598, 153-158.
- Liu S.Q., Pritchard G.G., Hardman M.J., Pilone G.J. Citrulline Production and Ethyl Carbamate (Urethane) Precursor Formation From Arginine Degradation by Wine Lactic-Acid Bacteria *Leuconostoc-Oenos* and *Lactobacillus-Buchneri*. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1994**, 45 (2), 235-242.
- Liu S.Q., Pritchard G.G., Hardman M.J., Pilone G.J. Occurrence of Arginine Deiminase Pathway Enzymes in Arginine Catabolism by Wine Lactic-Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **1995**, 61 (1), 310-316.
- Lonvaud-Funel A. Biogenic Amines in Wine: Role of Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **1**, 199, 9-13.
- Lonvaud-Funel A., Joyeux A. Histamine Production by Wine Lactic Acid Bacteria: Isolation of a Histamine-Producing Strain of *Leuconostoc Oenos*. *Journal of Applied Bacteriology*, **1994**, 77, 401-407.
- López R., Santamaría P., Gutiérrez A.R., Iñiguez M. Changes in Amino Acids During the Alcoholic Fermentation of Grape Juice at Different Temperatures. *Sciences des Aliments*, **1996**, 16 (5), 529-535.

- Lurton L.**, Segain J.P., Feuillat M. Proteolysis During the Autolysis of Yeasts Under Acidic Conditions, **1989**, 9 (1), 111-123.
- Manca de Nadra M.C.**, Farias M.E., Moreno Arribas V., Pueyo E., Polo M.C. A Proteolytic Effect of *Oenococcus oeni* on the Nitrogenous Macromolecular Fraction of Red Wine. FEMS Microbiology Letters, **1999**, 174 (1), 41-47.
- Manca de Nadra M.C.**, Farias M.E., Moreno-Arribas M.V., Pueyo E., Polo M.C. Proteolytic Activity of *Leuconostoc Oenos*. Effect on Proteins and Polypeptides From White Wine. FEMS Microbiology Letters, **1997**, 150 (1), 135-139.
- Manca de Nadra M.C.**, Nadra Chaud C.A., Pesce de Ruiz Holgado A., Oliver G. Synthesis of the Arginine Dihydrolase Pathway Enzymes in *Lactobacillus Buchneri*. Current Microbiology, **1986a**, 13 (5), 261-264.
- Manca de Nadra M.C.**, Nadra Chaud C.A., Pesce de Ruiz Holgado A., Oliver G. Arginine Metabolism in *Lactobacillus leichmannii*. Current Microbiology, **1986b**, 13 (3), 155-158.
- Mangani S.**, Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. Putrescine Accumulation in Wine: Role of *Oenococcus Oeni*. Current Microbiology, **2005**, 51 (1), 6-10.
- Marchal R.**, Bouquelet S., Maujean A. Purification and Partial Biochemical Characterization of Glycoproteins in a Champenois Chardonnay Wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1996**, 44 (7), 1716-1722.
- Marcobal A.**, Martín-Álvarez P.J., Polo M.C., Muñoz R., Moreno-Arribas M.V. Formation of Biogenic Amines Throughout the Industrial Manufacture of Red Wine. Journal of Food Protection, **2006**, 69 (2), 397-404.
- Marcobal A.**, Polo M.C., Martín-Álvarez P.J., Moreno-Arribas M.V. Biogenic Amine Content of Red Spanish Wines: Comparison of a Direct Elisa and an HPLC Method for the Determination of Histamine in Wines. Food Research International, **2005**, 38 (4), 387-394.
- Margheri G.**, Versini G., Dalla Serra A., Giannotti L., Pellegrini R., Mattarei C. L' Autolisi dei Lievito in Enologia. Vignevini, **1984**, 11, 25-28.
- Marín S.J.**, Jones B.A., Felix W.D., Clark J. Effect of High-Temperature on High-Performance Liquid Chromatography Column Stability and Performance Under Temperature-Programmed Conditions. Journal of Chromatography A, **2004**, 1030 (1-2), 255-262.

- Martín-Álvarez P.J.**, Marcobal A., Polo C., Moreno-Arribas M.V. Influence of Technological Practices on Biogenic Amine Contents in Red Wines. *European Food Research and Technology*, **2006**, 222 (3-4), 420-424.
- Martínez-Rodríguez A.**, Carrascosa A.V., Barcenilla J.M., Pozo-Bayón M.A., Polo M.C. Autolytic Capacity and Foam Analysis as Additional Criteria for the Selection of Yeast Strains for Sparkling Wine Production. *Food Microbiology*, **2001**, 18 (2), 183-191.
- Martínez-Rodríguez A.**, Polo M.C. Enological Aspects of Yeast Autolysis. Recent Research Developments in Microbiology, Vol. (4), part 1, **2000a**. Editado por S.G. Pandalai. Research Signpost, Trivandrum.
- Martínez-Rodríguez A.J.**, Carrascosa A.V., Martín-Álvarez P.J., Moreno-Arribas V., Polo M.C. Influence of the Yeast Strain on the Changes of the Amino Acids, Peptides and Proteins During Sparkling Wine Production by the Traditional Method. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2002**, 29 (6), 314-322.
- Martínez-Rodríguez A.J.**, Carrascosa A.V., Polo M.C. Release of Nitrogen Compounds to the Extracellular Medium by Three Strains of *Saccharomyces Cerevisiae* During Induced Autolysis in a Model Wine System. *International Journal of Food Microbiology*, **2001b**, 68 (1-2), 155-160.
- Martínez-Rodríguez A.J.**, Polo M.C. Characterization of the Nitrogen Compounds Released During Yeast Autolysis in a Model Wine System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000b**, 48 (4), 1081-1085.
- Martínez-Rodríguez A.J.**, Polo M.C. Effect of the Addition of Bentonite to the Tirage Solution on the Nitrogen Composition and Sensory Quality of Sparkling Wines. *Food Chemistry*, **2003**, 81 (3), 383-388.
- Maruyama S.**, Mitachi H., Tanaka H., Tomizuka N., Suzuki H. Studies on the Active Site and Antihypertensive Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors Derived From Casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1987**, 51 (6), 1581-1586.
- Maruyama S.**, Miyoshi S., Kaneko T., Tanaka H. Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Activities of Synthetic Peptides Related to the Tandem Repeated Sequence of a Maize Endosperm Protein. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1989**, 53 (4), 1077-1081.
- Matsufuji H.**, Matsui T., Seki E., Osajima K., Nakashima M., Osajima Y. Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory Peptides in an Alkaline Protease Hydrolyzate Derived From Sardine Muscle. *Bioscience Biotechnology And Biochemistry*, **1994**, 58 (12), 2244-2245.

- McCalley D.V.** Effect of Temperature and Flow-Rate on Analysis of Basic Compounds in High-Performance Liquid Chromatography Using a Reversed-Phase Column. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 902 (2), 311-321.
- Meisel H.** Bioactive Peptides From Milk Proteins: A Perspective for Consumers and Producers. *The Australian of Dairy Technology*, **2001**, 56 (2), 83-92.
- Meucci E., Mele M.C.** Amino Acids and Plasma Antioxidant Capacity. *Amino Acids*, **1997**, 12 (3-4), 373-377.
- Miguel M., López-Fandino R., Ramos M., Aleixandre A.** Short-Term Effect of Egg-White Hydrolysate Products on the Arterial Blood Pressure of Hypertensive Rats. *British Journal of Nutrition*, **2005**, 94 (5), 731-737.
- Miguel M., Recio I., Gómez-Ruiz J.A., Ramos M., Lopez-Fandino R.** Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived From Egg White Proteins by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Protection*, **2004**, 67 (9), 1914-1920.
- Miller D.J., Hawthorne S.B.** Subcritical Water Chromatography with Flame Ionization Detection. *Analytical Chemistry*, **1997**, 69 (4), 623-627.
- Minervini F., Algaron F., Rizzello C.G., Fox P.F., Monnet V., Gobbetti A.** Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial Peptides From *Lactobacillus Helveticus* PR4 Proteinase-Hydrolyzed Caseins of Milk From Six Species. *Applied and Environmental Microbiology*, **2003**, 69 (9), 5297-5305.
- Monteiro F.F., Bisson L.F.** Nitrogen Supplementation of Grape Juice. II. Effect on Amino-Acid and Urea Release Following Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1992**, 43 (1), 11-17.
- Montel M.C., Champomier M.C.** Arginine Catabolism in *Lactobacillus Sake* Isolated From Meat. *Applied and Environmental Microbiology*. **1987**, 53, 2683-2685.
- Moreno-Arribas M.V., Bartolomé B., Pueyo E., Polo M.C.** Isolation and Characterization of Individual Peptides From Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998b**, 46 (9), 3422-3425.
- Moreno-Arribas M.V., Polo M.C.** Winemaking Biochemistry and Microbiology: Current Knowledge and Future Trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2005**, 45 (4), 265-286.

- Moreno-Arribas V.**, Pueyo E., Nieto F.J., Martín-Álvarez P.J., Polo M.C. Influence of the Polysaccharides and the Nitrogen Compounds on Foaming Properties of Sparkling Wines. *Food Chemistry*, **2000**, 70 (3), 309-317.
- Moreno-Arribas V.**, Pueyo E., Polo M.C. Peptides in Musts and Wines. Changes During the Manufacture of Cavas (Sparkling Wines). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44 (12), 3783-3788.
- Moreno-Arribas V.**, Pueyo E., Polo M.C., Martín-Álvarez P.J. Changes in the Amino Acid Composition of the Different Nitrogenous Fractions During the Aging of Wine with Yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998a**, 46 (10), 4042-4051.
- Moskovitz J.**, Berlett B.S., Poston J.M., Stadtman E.R. The Yeast Peptide Methionine Sulfoxide Reductase Functions as an Antioxidant in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1997**, 94 (18), 9585-9589.
- Mullally M.M.**, Meisel H., Fitzgerald R.J. Identification of a Novel Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Corresponding to a Tryptic Fragment of Bovine β -Lactoglobulin. *FEBS Letters*, **1997**, 402 (2-3), 99-101.
- Nakamura Y.**, Yamamoto N., Sakai K., Takano T. Antihypertensive Effect of Sour Milk and Peptides Isolated From it That Are Inhibitors to Angiotensin I-Converting Enzyme. *Journal of Dairy Science*, **1995**, 78 (6), 1253-1257.
- Nunez Y.P.**, Carrascosa A.V., Gonzalez R., Polo M.C., Martinez-Rodriguez A. Isolation and Characterization of a Thermally Extracted Yeast Cell Wall Fraction Potentially Useful For Improving the Foaming Properties of Sparkling Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54 (20), 7898-7903.
- Nunez Y.P.**, Carrascosa A.V., González R., Polo M.C., Martínez-Rodríguez A.J. Effect of Accelerated Autolysis of Yeast on the Composition and Foaming Properties of Sparkling Wines Elaborated by a Champenoise Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53 (18), 7232-7237.
- Ohyama S.**, Ishibashi N., Tamura M., Nishizaki H., Okay H. Studies on Flavored Peptides. VI. Synthesis of Bitter Peptides Composed of Aspartic Acid and Glutamic Acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1988**, 52 (3), 871-872.
- Ondetti M.A.**, Cushman D.W. Enzymes of the Renin-Angiotensin System and Their Inhibitors. *Annual Review Biochemistry*, **1982**, 51, 283-308.

- Ondetti M.A.**, Williams N.J., Sabo E.F., Pluscec J., Weaver E.R., Kocy O. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors From the Venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, Elucidation of Structure, and Synthesis. *Biochemistry*, **1971**, 19 (22), 4033-4039.
- Otagiri K.**, Nosho Y., Shinoda I., Fukui H., Okay H. Studies on a Model of Bitter Peptides Including Arginine, Proline And Phenylalanine Residues. I. Bitter Taste of Di- and Tripeptides, and Bitterness Increase of the Model Peptides by Extension of the Peptide Chain. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1985**, 49 (4), 1019-1026.
- Ou B.**, Hampsch-Woodill M., Prior R.L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49 (10), 4619-4626.
- Ough C.S.**, Crowell E.A., Kunkee R.E., Vilas M.R., Lagier S. A Study of Histamine Production by Various Wine Bacteria in Model Solutions and in Wine. *Journal of Food Process and Preservation*, **1987**, 12, 65-70.
- Ough C.S.**, Huang Z., An D., Stevens D. Amino-Acid-Uptake by 4 Commercial Yeasts at 2 Different Temperatures of Growth and Fermentation - Effects on Urea Excretion and Reabsorption. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1991**, 42 (1), 26-40.
- Pan D.**, Luo Y.K. Tanokura M. Antihypertensive Peptides From Skimmed Milk Hydrolysate Digested by Cell-Free Extract of *Lactobacillus Helveticus* JCM1004. *Food Chemistry*, **2005**, 91 (1), 123-129.
- Papayannopoulos I.A.** The Interpretation of Collision-Induced Dissociation Tandem Mass-Spectra of Peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, **1995**, 14 (1), 49-73.
- Park E.Y.**, Murakami H., Matsumura Y. Effects of the Addition of Amino Acids and Peptides on Lipid Oxidation in a Powdery Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53 (21), 8334-8341.
- Pellegrini A.**, Thomas U., Bramaz N., Hunziker P., von Fellenberg R. Isolation and Identification of Three Bactericidal Domains in the Bovine Alpha-Lactalbumin Molecule. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, **1999**, 1426 (3), 439-448.
- Peng Z.K.**, Pocock K.F., Waters E.J., Francis I.L., Williams P.J. Taste Properties of Grape (*Vitis vinifera*) Pathogenesis-Related Proteins Isolated From Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45 (12), 4639-4643.

- Perrin E.**, Miclo L., Driou A., Linden G. Rapid-Determination of the Ratios of 3 Aromatic Residues in Peptides by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography with a High-Resolution Photodiode-Array Detector. *Journal of Chromatography B*, **1995**, 664 (1), 267-276.
- Perrot L.**, Charpentier M., Charpentier C., Feuillat M., Chassagne D. Yeast Adapted to Wine: Nitrogen Compounds Released During Induced Autolysis in a Model Wine. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2002**, 29, 134-139.
- Polo M.C.**, González-Llano D., Ramos M. HPLC of Peptides. In: *Leo Nollet Food Analysis by HPLC (Food Science and Technology Series)*. New York: Marcel Dekker Inc., **2000**, pp. 99-125.
- Postel W.**, Ziegler L. Influence of the Duration of Yeast Contact and of the Manufacturing Process on the Composition and Quality of Sparkling Wines. II. Free Amino Acids and Volatile Compounds. *Die Wein-Wissenschaft (Viticultural and Enological Sciences)*, **1991**, 46, 26-32.
- Poux C.**, Ournac A. Free and Polypeptidic Amino-Acids in Wine. *Annales de Technologie Agricole*, **1970**, 19 (3), 217-237.
- Pozo-Bayón M.A.**, Alcaide J.M., Polo M.C., Pueyo E. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Compounds In White and Red Wines. *Food Chemistry*, **2007**, 100 (1), 43-47.
- Pozo-Bayón M.A.**, Alegría E.G., Polo M.C., Tenorio C., Martín-Álvarez P.J., De la Banda M.T.C., Ruiz-Larrea F., Moreno-Arribas M.V. Wine Volatile and Amino Acid Composition After Malolactic Fermentation: Effect of *Oenococcus Oeni* and *Lactobacillus Plantarum* Starter Cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53 (22), 8729-8735.
- Pueyo E.**, Dizy M, Polo M.C. Varietal Differentiation of Must and Wines by Means of Protein-Fraction. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1993**, 44 (3), 255-260.
- Pueyo E.**, Polo M.C., Olano A. Neutral Monosaccharides Composition of the Polysaccharides From Musts, Wines and Cava Wines. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, **1995**, 35, 191-201.
- Quirós A.**, Hernández-Ledesma B., Ramos M., Amigo L., Recio I. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived From Caprine Kefir. Behaviour of Active Peptides Under Simulated Gastrointestinal Digestion. *Journal of Dairy Science*, **2005**, 88, 3480-3487.

- Recio I.**, Visser S. Identification of Two Distinct Antibacterial Domains within the Sequence of Bovine Alpha(S2)-Casein. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, **1999**, 1428 (2-3), 314-326.
- Remize F.**, Gaudin A., Kong Y., Guzzo J., Alexandre H., Krieger S., Guilloux-Benatier M. *Oenococcus Oeni* Preference for Peptides: Qualitative and Quantitative Analysis of Nitrogen Assimilation. *Archives of Microbiology*, **2006**, 185 (6), 459-469.
- Ribereau-Gayon J.**, Peynaud E., Sudraud P., Ribereau-Gayon P. *Sciences et Techniques du Vin*, Vol. II, **1975**, Dunod, Paris.
- Rodríguez M.**, Bland J.M., Tsang J.W., Goodman M. Peptide Sweeteners. 8. Synthesis and Structure Taste Relationship Studies of L-Aspartyl-D-Alanyl Tripeptides. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1985**, 28 (10), 1527-1529.
- Rollan G.C.**, Coton E., Lonvaud-Funel A. Histidine Decarboxylase Activity of *Leuconostoc Oenos* 9204. *Food Microbiology*, **1995**, 12 (6), 455-461.
- Rollan G.C.**, Farias M.E., Manca de Nadra M.C. Protease Production by *Leuconostoc oenos* Strains Isolated From Wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **1993**, 9 (5), 587-589.
- Saito Y.**, Nakamura K.W., Kawato A., Imayasu S. Structure and Activity of Angiotensin-I Converting-Enzyme Inhibitory Peptides From Sake and Sake Lees. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **1994b**, 58 (10), 1767-1771.
- Salmon J.M.**, Vuchot P., Doco T., Moutounet M. Maintenance and Protection of Yeast Morphology by Contact with Wine Polyphenols During Simulation of Wine Aging on Lees. *Journal of Food Science*, **2003**, 68, 1782-1787.
- Segura A.**, Moreno M., Molina A., García-Olmedo F. Novel Defensin Subfamily From Spinach (*Spinacia Oleracea*). *FEBS Letters*, **1998**, 435 (2-3), 159-162.
- Shimizu M.**, Lee S.W., Kaminogawa S., Yamauchi K. Emulsifying Properties of an N-terminal Peptide From the Peptic Hydrolyzate of Alphas1-Casein. *Journal of Food Science*, **1984**, 49 (4), 1117-1120.
- Silla Santos M.H.** Biogenic Amines: Their Importance in Foods. *International Journal of Food Microbiology*, **1996**, 29, 213-231.
- Silva S.V.**, Pihlanto A., Malcata F.X. Bioactive Peptides in Ovine and Caprine Cheeselike Systems Prepared with Proteases From *Cynara Cardunculus*. *Journal of Dairy Science*, **2006**, 89 (9), 3336-3344.

- Skeggs L.T.**, Marsh W.H., Kahn J.R., Shumway N.P. The Existence of Two Forms of Hypertensin. *Journal of Experimental Medicine*, **1954**, 99 (3), 275-282.
- Smith R.M.**, Burgess R.J. Superheated Water as an Eluent for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal Of Chromatography A*, **1997**, 785 (1-2), 49-55.
- Soufleros E.**, Barrios M.L., Bertrand A. Correlation Between the Content of Biogenic Amines and Other Wine Compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1998**, 49, 266-278.
- Stratton J.E.**, Hutkins R.W., Taylor S.L. Biogenic-Amines in Cheese and Other Fermented Foods - A Review. *Journal of Food Protection*, **1991**, 54 (6), 460-470.
- Suárez M.A.**, Polo M.C., Llaguno C. Étude de la Composition des Vins Mousseux Pendant la Prise de Mousse et au Cours du Viellissement en Bouteilles. *Connaissance Vigne et Vin*, **1979**, 13, 199-217.
- Sun L.F.**, Carr P.W. Mixed-Mode Retention of Peptides on Phosphate-Modified Polybutadiene-Coated Zirconia. *Analytical Chemistry*, **1995**, 67 (15), 2517-2523.
- Suzzi G.**, Romano P., Zambonelli C. Flocculation of Wine Yeasts: Frequency, Differences and Stability of the Character. *Canadian Journal of Microbiology*, **1984**, 30 (1), 36-39.
- Takayanagi T.**, Yokotsuka K. Angiotensin I Converting Enzyme-Inhibitory Peptides From Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50 (1), 65-68.
- ten Brink B.**, Damink C., Joosten H.M.L.J., Huis in't Veld J.H.J. Occurrence and Formation of Biologically Active Amines in Foods. *International Journal of Food Microbiology*, **1990**, 11, 73-84.
- Thompson J.D.**, Brown J.S., Carr P.W. Dependence of Thermal Mismatch Broadening on Column Diameter in High-Speed Liquid Chromatography at Elevated Temperatures. *Analytical Chemistry*, **2001**, 73 (14), 3340-3347.
- Thompson J.D.**, Carr P.W. A Study of the Critical Criteria for Analyte Stability in High-Temperature Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, **2002**, 74 (5), 1017-1023.
- Tourdou-Marechal R.**, Fortier L.C., Guzzo J., Lee B., Divies C. Acid Sensitivity of Neomycin-Resistant Mutants of *Oenococcus Oeni*. A Relationship Between Reduction of ATPase Activity and Lack of Malolactic Activity. *FEMS Microbiology Letters*, **1999**, 178 (2), 319-326.

- Trones R.**, Tangen A., Lund W., Greibrokk T. Packed Capillary High-Temperature Liquid Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1999**, 835 (1-2), 105-112.
- Troyano E.**, Olano A., Fernández-Díaz M., Sanz J., Martínez-Castro I. Gas-Chromatographic Analysis of Free Monosaccharides in Milk. *Chromatographia*, **1991**, 32 (7-8), 379-382.
- Tsai J.S.**, Lin T.C., Chen J.L., Pan B.S. The Inhibitory Effects of Freshwater Clam (*Corbicula Fluminea*, Muller) Muscle Protein Hydrolysates on Angiotensin I Converting Enzyme. *Process Biochemistry*, **2006**, 41 (11), 2276-2281.
- Tsang J.W.**, Schmied B., Nyfeler R., Goodman M. Peptide Sweeteners. VI. Structural Studies on the C-terminal Amino-Acid of L-Aspartyl Dipeptide Sweeteners. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1984**, 27 (12), 1663-1668.
- Tsuji K.**, Goetz J.F. Elevated Column Temperature for High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Erythromycin and Erythromycin Ethylsuccinate. *Journal of Chromatography*, **1978**, 157, 185-196.
- Ugliano M.**, Bartowsky E.J., McCarthy J., Moio L., Henschke P.A. Hydrolysis and Transformation of Grape Glycosidically Bound Volatile Compounds During Fermentation with Three *Saccharomyces* Yeast Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54 (17), 6322-6331.
- Ugliano M.**, Genovese A., Moio L. Hydrolysis of Wine Aroma Precursors During Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus Oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51 (17), 5073-5078.
- Usseglio-Tomasset L.**, Bosia P.D. Aminoacids and Oligopeptides Development From the Must to the Wine. *Bullettin de L'Office International de la Vigne et du Vin*, **1990**, 63, 21-46.
- Usseglio-Tomasset L.**, Bosia P.D., Di Stefano R., Castino M. The Objective Influence of Yeast Contact on the Characteristics of Sparkling Wines Prepared by the Classic Method. *Vini d'Italia*, **1983**, 142, 3-9.
- Usseglio-Tomasset L.**, Di Stefano R. Osservazioni Sulle Sostanze Azotate dei Vini in Relazione Alle Loro Dimensioni Molecolari. *Annali Dell'Istituto Sperimentali per L'Enologia Asti*, **1978**, 9, 101-114.
- Vázquez-Lasa M.B.**, Iñiguez-Crespo M., González-Larraina M., González-Guerrero A. Biogenic Amines in Rioja Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1998**, 49 (2), 229-229.

- Vidal Carou M.C.**, Cordony-Salcedo R., Mariné-Font A. Histamine and Tyramine in Spanish Wines: Relationships with Total Sulfur Dioxide Level, Volatile Acidity and Malolactic Fermentation Intensity. *Food Chemistry*, **1990**, 35, 217-227.
- Vidal S.**, Williams P., Doco T., Moutounet M., Pellerin P. The Polysaccharides of Red Wine: Total Fractionation and Characterization. *Carbohydrate Polymers*, **2003**, 54 (4), 439-447.
- Vidal-Carou M.C.**, Codony-Salcedo R., Mariné-Font A. Changes in the Concentration of Histamine and Tyramine During Wine Spoilage at Various Temperatures. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1991**, 42, 145-149.
- Visser S.**, Slangen K.J., Hup G. Some Bitter Peptides From Rennet-Treated Casein. A Method for Their Purification, Utilizing Chromatographic Separation on Silica Gel. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **1975**, 29 (4), 319-334.
- Warren F.V.**, Bidlingmeyer B.A. Influence of Temperature on Column Efficiency in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, **1988**, 60 (24), 2021-2024.
- Waters E.J.**, Hayasaka Y., Tattersall D.B., Adams K.S., Williams P.J. Sequence Analysis of Grape (*Vitis vinifera*) Berry Chitinases That Cause Haze Formation in Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46 (12), 4950-4957.
- Waters E.J.**, Peng K.F., Pocock K.F., Williams P.J. Proteins in White Wine, II: Their Resistance to Proteolysis is not Due to Either Phenolic Association or Glycosylation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **1995**, 1, 94-99.
- Waters E.J.**, Shirley N.J., Williams P.J. Nuisance Proteins of Wine Are Grape Pathogenesis-Related Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44 (1), 3-5.
- Waters E.J.**, Wallace W., Williams P.J. Heat Haze Characteristics of Fractionated Wine Proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1991**, 42 (2), 123-127.
- Waters E.J.**, Wallace W., Williams P.J. Identification of Heat-Unstable Wine Proteins and Their Resistance to Peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1992**, 40 (9), 1514-1519.
- Wolcott R.G.**, Dolan J.W., Snyder L.R., Bakalyar S.R., Arnold M.A., Nichols J.A. Control of Column Temperature in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 869 (1-2), 211-230.

- Yamamoto N.**, Ejiri M., Mizuno S. Biogenic Peptides and Their Potential Use. *Current Pharmaceutical Design*, **2003**, 9, 1345-1355.
- Yan B.W.**, Zhao J.H., Brown J.S., Blackwell J., Carr P.W. High-Temperature Ultrafast Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72 (6), 1253-1262.
- Yang Y.**, Belghazi M., Lagadec A., Miller D.J., Hawthorne S.B. Elution of Organic Solutes From Different Polarity Sorbents Using Subcritical Water. *Journal of Chromatography A*, **1998**, 810 (1-2), 149-159.
- Yang Y.**, Bowadt S., Hawthorne S.B., Miller D.J. Subcritical Water Extraction of Polychlorinated Biphenyls From Soil and Sediment. *Analytical Chemistry*, **1995**, 67 (24), 4571-4576.
- YanJun Y.**, Marczak E.D., Yokoo M., Usui H., Yoshikawa M., Isolation and Antihypertensive Effect of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides From Spinach Rubisco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 4897-4902.
- Yokotsuka K.**, Aihara T., Umehara Y., Kushida T. Chemical Studies on Coloring and Flavoring Substances in Japanese Grapes and Wines III. Free Amino-Acids and Peptides in Musts and Wines From Japanese Grapes. *Journal of Fermentation Technology*, **1975**, 53 (8), 631-635.
- Zee J.A.**, Simard R.E., Lheureux L., Tremblay J. Biogenic-Amines in Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1983**, 34 (1), 6-9.
- ZirChrom Separations, Inc.** Vol.1 - Using Elevated Temperature to Improve HPLC Separations. **2002**. www.zirchrom.com